

RAVANA ANGELINI SFALCIN

Análise da penetração de materiais resinosos experimentais em lesões iniciais de cárie em esmalte por meio de Microscopia Confocal

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Materiais Dentários.

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Maria Puppim Rontani

Piracicaba
2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

Sf14a	<p>Sfalcin, Ravana Angelini. Análise da penetração de materiais resinosos experimentais em lesões iniciais de cárie em esmalte por meio de MCVL / Ravana Angelini Sfalcin. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Regina Maria Puppini-Rontani. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Materiais dentários. 2. Infiltração dentária. 3. Monômeros. I. Puppini-Rontani, Regina Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (eras/fop)</p>
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Título em Inglês: Analysis of penetration of experimental resin materials into initial enamel caries by CLSM

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Dental materials. 2. Dental leakage. 3. Monomers

Área de Concentração: Materiais Dentários

Titulação: Mestre em Materiais Dentários

Banca Examinadora: Regina Maria Puppini-Rontani, Roberta Caroline Bruschi Alonso, Fernanda Miori Pascon

Data da Defesa: 21-02-2011

Programa de Pós-Graduação em Materiais Dentários



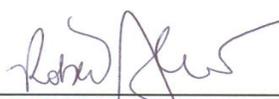
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 21 de Fevereiro de 2011, considerou a candidata RAVANA ANGELINI SFALCIN aprovada.



Profa. Dra. REGINA MARIA PUPPIN RONTANI



Profa. Dra. ROBERTA CAROLINE BRUSCHI ALONSO



Profa. Dra. FERNANDA MIORI PASCON

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, Jorge e Márcia, que sempre estiveram me apoiando, e me dando forças para superar os obstáculos encontrados ao longo da vida, não poupando esforços para a formação de seus filhos, incentivando e sempre apoiando as minhas decisões. Sem vocês não teria conseguido tudo o que conquistei até hoje!

Aos meus irmãos, Renato e Roberta, por toda amizade, companheirismo, alegria e amor que me transmitem em todos os momentos, por sempre terem me apoiado e me estimulado ao longo desses anos de estudos.

Agradecimentos especiais

A Deus, por estar sempre do meu lado me iluminando e me dando sabedoria para tomar as decisões corretas, e por sempre abrir as portas para caminhos bons que irão ser fundamentais para o meu crescimento.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Regina Maria Puppim Rontani, pela paciência em me ensinar, pela confiança, incentivo, oportunidades e pelo apoio em todos os momentos de dificuldades.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, em nome do diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior.

Aos professores da Área de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Prof. Dr. Simonídes Consani, Prof. Dr. Mário Fernando de Góes, Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho, Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoretti e Prof^a Dr^a Marcela Rocha de Oliveira Carrilho, ao professor da Área de Prótese, Prof. Dr. Rafael Leonardo Xediek Consani, e aos professores da Área de Dentística Restauradora, dessa mesma faculdade, Prof. Dr. Luís Roberto Marcondes Martins e Prof. Dr. Marcelo Giannini pelo empenho, respeito e dedicação durante as aulas e no decorrer do curso, contribuindo para minha formação científica.

À Prof^a Dr^a Roberta Caroline Bruschi Alonso, docente da Universidade Bandeirantes – São Paulo (UNIBAN-SP), que sempre esteve disposta a ajudar e ensinar, com paciência, amizade e dedicação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários do Laboratório de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Marcos Blanco Cangiani, pela disponibilidade de auxílio em todos os momentos de dificuldade encontrados, e Selma Aparecida Barbosa Segalla, secretária do laboratório de Materiais Dentários, por ser sempre prestativa.

Ao funcionário do Laboratório de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Marcelo Corrêa Maistro, pela dedicação, seriedade e paciência, auxiliando para o andamento deste projeto.

Aos técnicos responsáveis pelo departamento de Microscopia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Adriano Luis Martins e Eliene Aparecida Orsini Narvaes Romani, pela paciência e dedicação em auxiliar, ensinar e esclarecer todas as dúvidas durante o andamento do projeto.

Aos amigos de mestrado, Ana Paula, Ariene, Carlos, César, Guilherme, Isadora, Marcos, Renata e Victor por dividirem esta experiência comigo.

Aos amigos do doutorado, Ailla, Adriana, Andréia, Ana Rosa, Cristina, Polliana, Alberto, Aloísio, Rafael, Gislaine, Lucas, pela amizade e troca de experiências.

Às minhas amigas-irmãs, Roberta e Tatiany, que sempre estiveram do meu lado, me apoiando, me incentivando, me dando forças em todos os momentos de dificuldade, me dando palavras de conforto nas vezes em que desanimei e estando sempre presentes nos momentos de felicidades e conquistas.

A todos que indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a penetração de materiais resinosos experimentais de baixa viscosidade em lesões artificiais sub-superficiais de cárie em esmalte (LASCE), por meio de Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL). Cinquenta e cinco terceiros molares humanos extraídos e livres de cárie foram selecionados. Blocos da superfície oclusal foram obtidos e distribuídos em 11 grupos (n=5), dos quais 5 blocos foram mantidos hígidos (Grupo Controle Positivo) e os demais submetidos a produção de cárie *in vitro*. Os blocos de esmalte oclusal cariados foram distribuídos aleatoriamente de acordo com a composição do material em: Grupo Controle Negativo (dente cariado); G1: 100% TEGDMA, G2: 80% TEGDMA + 20% etanol, G3: 80% TEGDMA + 20% HEMA, G4: 75% TEGDMA + 25% UDMA, G5: 60% TEGDMA + 20% UDMA + 20% etanol, G6: 60% TEGDMA + 20% UDMA + 20% HEMA, G7: 75% TEGDMA + 25% BisEMA, G8: 60% TEGDMA + 20% BisEMA + 20% etanol e G9: 60% TEGDMA + 20% BisEMA + 20% HEMA. Os materiais experimentais foram impregnados com corante isotiocianato de rodamina B a 0,1 % anterior a aplicação na superfície oclusal, e após fotoativado (40 s), os blocos foram seccionados em fatias de 0,5 mm, e estas foram deixadas em solução etanólica de fluoresceína de sódio 100 µM por 3 min, para visualização em Microscopia Confocal de Varredura a Laser. A análise das imagens foi feita através do programa LAS AF Lite, e em seguida as médias de intensidade foram convertidas em porcentagem pelo Microsoft Excel. Os valores de porcentagem obtidos foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey, em nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que a maior média de intensidade de fluorescência, indicando o maior percentual de preenchimento ocorrido na lesão de cárie, ocorreu no G7, enquanto o menor valor foi obtido pelo grupo G5. Pode-se concluir que diferentes concentrações monoméricas e composição de misturas em composto resinoso de baixa viscosidade produzem diferentes percentuais de penetração e preenchimento de lesões cariosas em esmalte. Os maiores valores de preenchimento das lesões

foram obtidos com a mistura TEGDMA+BisEMA e os mais baixos para TEGDMA+UDMA+etanol

Palavras chave: lesão incipiente de cárie em esmalte, microscopia confocal de varredura a laser, monômeros

Abstract

The aim of this study was to evaluate the penetration of low viscosity experimental resin materials containing different combinations of resin monomers/diluents in enamel-like caries lesions using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). Nine experimental resin materials containing TEGDMA as a base monomer and varying the other monomers and solvents BisEMA, HEMA, UDMA and ethanol were prepared in different proportions. Fifty and five sound and extracted third human molars were used. The crown fragments were obtained and distributed in 11 groups (n=5), which 5 crown fragments were maintained sound (Positive Control Group) and the others were submitted to in vitro lesion caries production. The crown fragments were distributed randomly according to material composition: Negative Control Group (cariou teeth); Cariou and infiltrated blocks: G1: 100% TEGDMA, G2: 80% TEGDMA + 20% ethanol, G3: 80% TEGDMA + 20% HEMA, G4: 75% TEGDMA + 25% UDMA, G5: 60% TEGDMA + 20% UDMA + 20% ethanol, G6: 60% TEGDMA + 20% UDMA + 20% HEMA, G7: 75% TEGDMA + 25% BisEMA, G8: 60% TEGDMA + 20% BisEMA + 20% ethanol and Group 9: 60% TEGDMA + 20% BisEMA + 20% HEMA. Experimental materials were labeled with the red fluorophore rhodamine B isothiocyanate (RITC 0,1%; Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) prior to the application on occlusal surface, and after light cured (40 s), 0,5 mm thin sections were prepared and immersed in a 50% ethanolic solution of 100 µM sodium fluorescein (NaFL, Sigma Aldrich) for 3 min, to confocal microscopy visualization. Analysis of images was made by program LAS AF Lite, then, intensity means were converted in percentage by Microsoft Excel. Percentage values obtained were submitted to ANOVA Tukey's test, at significance level of 5%. Results showed that that the highest mean of fluorescence intensity, indicating fulfilling percentage penetration occurred into caries lesion, was obtained in the G7, while lower value was obtained by G5. It could be concluded that different monomeric concentrations and composition of low viscosity resin blends produce different percentage of penetration and fulfilling

of initial enamel-like caries lesions. The best results were obtained for TEGDMA+BisEMA and the lowest results for TEGDMA+UDMA+ethanol

Keywords: enamel initial caries lesion, confocal laser scanning microscopy, monomers.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
3. PROPOSIÇÃO	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Seleção e preparo dos dentes	22
4.2 Produção das lesões artificiais sub-superficiais de cárie em esmalte e obtenção das secções do grupo controle negativo	24
4.3 Confeccção dos espécimes	25
4.4 Análise da profundidade de lesão artificial sub-superficial de cárie em esmalte em Microscopia de Luz Polarizada	27
4.5 Análise da profundidade de penetração e adaptação à superfície do esmalte em MCVL	28
4.6 Análise estatística	31
5. RESULTADOS	32
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	43
ANEXO	55

1 INTRODUÇÃO

As superfícies oclusais, devido às características próprias como sulcos e fissuras, e as proximais, devido ao contato interproximal, oferecem dificuldade de higienização sendo os locais mais propícios ao acúmulo de biofilme, e subsequente abrigo para microorganismos. Estas regiões oclusais apresentam-se mais susceptíveis à formação de lesões de cárie (Carvalho *et al.*, 1989), representando cerca de 55 a 60% de todas as superfícies cariadas na faixa etária de 5 a 17 anos de idade em áreas com ou sem fluoretação das águas de abastecimento com índice CPOS oclusal de 1,7 e 1,9, respectivamente (Hicks *et al.*, 2000).

Clinicamente, as lesões iniciais de cárie apresentam-se como regiões esbranquiçadas e opacas na superfície do esmalte produzidas pela desmineralização ácida intermitente, alternada por períodos de remineralização produzida pelos componentes orgânicos e inorgânicos da saliva (Bergman & Lind, 1966; Silverstone, 1973). A desmineralização produzida pelos ácidos do biofilme afeta a área interprismática mais do que os prismas e tende a seguir as estrias de Retzius. Assim, lesões iniciais de cárie são áreas de esmalte precocemente desmineralizado devido ao aumento da porosidade produzido pelo aumento do espaço intercrystalino que pode subsequente tornar-se preenchido por material orgânico amorfo no centro e ao redor dos prismas (Frank, 1965). A lesão inicial de cárie no esmalte pode ser revertida, ou seja, remineralizada ou paralisada por efeito coadjuvante de fluoretos, remoção do biofilme aderido e controle da dieta. Porém, esses meios são paciente-dependentes, isto é, dependem exclusivamente da colaboração do paciente, e o *compliance* é relativamente baixo (Kidd & van Amerongen, 2003).

Deste modo, a fim de introduzir uma técnica alternativa que não dependesse exclusivamente da colaboração do paciente para paralisar ou impedir a progressão destas lesões de cárie, tem sido proposta a utilização de monômeros resinosos fotopolimerizáveis de baixa viscosidade com a capacidade de infiltrar

nestas lesões subsuperficiais (Paris, 2007) e assim estabilizar mecanicamente a estrutura frágil da lesão.

Davila *et al.* (1975) observaram que lesões iniciais de cárie em esmalte podem ser infiltradas por monômeros resinosos formando polímeros e tornando a região menos suscetível à dissolução ácida, prevenindo a desmineralização. Esta técnica de infiltração do material seria interessante para ser aplicada inclusive em áreas de contato oclusal, pois forma-se uma fina camada de polímero na superfície do esmalte (11 μm) com capacidade de penetrar até 60 μm no interior do esmalte.

O líquido infiltrante deve ter baixa viscosidade para poder penetrar no interior da lesão e preencher parcial ou totalmente os microespaços deixados pela desmineralização, tornando a lesão ácido-resistente. Entretanto, a lesão de cárie produzida *in vivo* difere da produzida *in vitro* pois, aquelas acontecem não por uma exposição contínua ao ácido, mas, por exposições intermitentes, alternadas por períodos de remineralização pela saliva (Silverstone, 1973).

Em estudo prévio, adesivos e selantes foram utilizados a fim de promover esta infiltração em lesões de cárie em esmalte. Estes materiais testados apresentavam características como baixa viscosidade, baixo ângulo de contato e alta tensão superficial, promovendo a penetração do material no interior da lesão, porém esta penetração apresentou um valor baixo quando comparada aos materiais resinosos experimentais de baixa viscosidade estudados (Paris, 2007).

Desta forma, a fim de diferenciar estes materiais resinosos experimentais desenvolvidos para a infiltração em lesões de cárie em esmalte dos selantes e adesivos conhecidos, estes materiais foram intitulados como “infiltrantes” (Paris, 2007).

Os selantes de fóssulas e fissuras quando comparados aos adesivos, não possuem boa capacidade de penetração nas lesões, formando apenas uma barreira superficial, portanto não reforçando a estrutura fragilizada pela desmineralização (Paris *et al.*, 2007). Deve-se, entretanto, levar em consideração que os materiais que teriam maior capacidade de penetrar de maneira rápida na

estrutura da lesão devido a presença de alto conteúdo de solvente, provavelmente não teriam resistência suficiente para resistir às influências negativas do ambiente bucal. Aliado a isso, alguns estudos têm demonstrado que os materiais seladores para fósulas e fissuras são demasiadamente viscosos para permitir a penetração no corpo da lesão. Mesmo adesivos comerciais que possuem baixa viscosidade têm apresentado pequena capacidade de penetração nas lesões de cárie e ainda com o agravante de apresentar baixa quantidade de monômeros hidrófobos que determinariam as propriedades físicas, e alta quantidade de diluentes e solventes que aumentariam a fluidez do material e a fácil degradação no ambiente bucal devido à hidrofobia (Paris *et al.*, 2007).

A maioria dos compósitos resinosos comerciais utilizam bisfenilglicidil dimetacrilato (BisGMA, peso molecular $PM = 512.6 \text{ g mol}^{-1}$) como monômero base da matriz resinosa (Peutzfeldt, 1997). Porém, como resulta em alta viscosidade ($\eta=600-1000 \text{ Pa s}$), por possuir dois grupamentos metacrilatos na molécula, assim como anéis aromáticos e grupamentos hidroxila, o uso de co-monômeros diluentes se torna necessário para permitir a incorporação da carga inorgânica (Dickens *et al.*, 2003; Rueggeberg, 2002). Substitutos do BisGMA como bisfenol A dimetacrilato etoxilato (BisEMA: $PM: 540 \text{ g mol}^{-1}$; $\eta=3 \text{ Pa s}$) e o uretano dimetacrilato (UDMA: $PM=470 \text{ g mol}^{-1}$) são encontrados em alguns produtos comerciais a fim de diminuir a viscosidade do produto final (Ferracane, 2001). Como diluentes, são utilizados monômeros como o trietileno glicol dimetacrilato (TEGDMA) assim como o HEMA (2-hidroxietil metacrilato) (Collares, 2007). O co-monômero mais comumente utilizado é o TEGDMA, por possuir baixo PM (286.2 g mol^{-1}) e baixa viscosidade ($\eta=0,05 \text{ Pa s}$) reduzindo a viscosidade da mistura (Atai & Watts, 2006; Floyd & Dickens, 2006). Porém, o HEMA também pode ser utilizado como diluente devido ao menor tamanho de sua molécula, apresentando alto coeficiente de penetração, e por ser solúvel nos três solventes mais utilizados na composição dos materiais resinosos - água, etanol e acetona (Sideridou *et al.*, 2003).

Sendo assim, monômeros podem ser utilizados para a formulação de infiltrantes, tendo em vista as propriedades necessárias a um bom infiltrante: baixa viscosidade, alto coeficiente de penetração, baixo ângulo de contato, alta capacidade de molhamento e alta resistência a degradação.

Várias metodologias têm sido empregadas para avaliar o desempenho de materiais adesivos, seladores e infiltrantes quando utilizados em odontologia. Trabalhos laboratoriais, incluindo avaliação de micro infiltração marginal (Gillet *et al.*, 2002; Perry & Rueggeberg, 2003; Perez *et al.*, 2000; Hanning & Grafe, 2004), retenção dos selantes e a proteção à cárie dentária (Pereira *et al.*, 2001; Aranda & Garcia-Godoy, 1995, Futatsuki *et al.*, 2001; Áudio-Gold, 2002; Feigal & Quelhas, 2003), testes de cisalhamento (el-Kalla & Garcia-Godoy, 1998; Perez-Lajarin *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2003), testes de tração (Torii *et al.*, 2002) e testes de microtração, avaliação da retenção dos selantes através de microscopia eletrônica de transmissão (Tay, 2005) têm sido utilizados.

Outra técnica introduzida na odontologia desde 1987 que tem sido utilizada para visualizar as estruturas de união de materiais restauradores ao substrato dentário é a microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). Através da incorporação de corantes fluorescentes (fluoróforos) aos materiais a serem analisados como, por exemplo, primer, adesivo ou material selador, sem necessidade de desidratação das amostras e portanto, com menor agregação de artefatos de técnica, este tipo de análise permite avaliar a profundidade de penetração de materiais específicos ao substrato dentário (Imazato *et al.*, 2002) pela visualização da separação cromatográfica da mistura de corante e material da estrutura dentária.

Dessa forma, torna-se importante avaliar a penetração de materiais resinosos de baixa viscosidade com o objetivo de obter formulações mais adequadas para a infiltração do material na lesão inicial de cárie em esmalte.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A fluoretação das águas de abastecimento público é considerada a medida mais eficaz de prevenção contra a cárie dentária. Apresenta grande alcance populacional, promovendo efetiva redução na incidência de cárie em populações de diferentes níveis sócio-econômicos, independentemente da cooperação e do interesse dos mesmos (Newbrun, 1988). Isso pode ser demonstrado através de estudos em comunidades que consomem água fluoretada em concentrações ideais (0,70 ppm), sem interrupções, chegando a apresentar uma redução de 50 a 60% nos níveis de cárie dentária (Cury, 1989; Cury, 1992; Newbrun, 1988; Pereira, 1995). Paralelamente, a crescente utilização de dentifrícios fluoretados e a implantação de programas preventivos (conscientização da população em relação à saúde bucal e ênfase à educação para a saúde) tem contribuído para a redução da prevalência de cárie no país (Narvai, 1996; Gushi, 2002).

O fluoreto tem o papel de interferir no desenvolvimento da cárie dentária, atuando no controle desta pela participação ativa durante o processo de desmineralização e remineralização. Se estiver presente constantemente no meio bucal, o fluoreto diminui a velocidade de perda mineral quando ocorre episódios de diminuição de pH. A ação dos fluoretos é considerada muito mais “curativa”, terapêutica, impedindo a progressão da lesão, do que preventiva. Tem sido demonstrado que mais importante que a quantidade de fluoretos incorporada à grade cristalina do esmalte durante sua formação é a presença deste em solução aquosa na interface placa-saliva-esmalte tem função preponderante, atuando no processo de des-remineralização (Rodrigues, 2003; Villena & Cury, 2005).

O fluoreto interfere também no crescimento e metabolismo bacterianos, atua na cadeia glicolítica, reduzindo a produção de ácidos pelos microrganismos bucais e interferindo na regulação enzimática do metabolismo dos carboidratos, o que reduz o acúmulo de polissacarídeos intra e extra celulares (Maltz, 2000; Cameron & Widmer, 2001).

Outro método eficaz utilizado nas áreas clínica e escolar, para prevenção da cárie em crianças de diferentes níveis de risco de cárie, tem sido a aplicação de selantes (Ahovuo-Saloranta *et al.*, 2004). Entretanto, a eficácia desta técnica no controle da cárie dental é limitada.

Apesar da evidência da eficácia primária, a prevalência do selante entre crianças de baixa renda (que estão em maior risco de cárie dentária) é de cerca de 30% (Dye *et al.*, 2007), bem abaixo do objetivo de saúde para a população em 2010 que seria de 50%.

Requisitos de um selante eficiente incluem: (1) baixa viscosidade, permitindo a penetração em fissuras profundas e estreitas, mesmo em dentes superiores; (2) tempo de trabalho adequado; (3) presa rápida; (4) boa e prolongada adesão ao esmalte; (5) baixa sorção e solubilidade; (6) alta resistência ao desgaste; (7) irritação mínima aos tecidos; (8) ação cariostática (Brauer, 1978).

Estudo prévio avaliou o efeito de um sistema adesivo à base de álcool na microinfiltração e profundidade de penetração do selante em fissuras após diferentes circunstâncias de contaminação de superfície. O selamento de fósulas e fissuras frequentemente traz o risco de contaminação, influenciando na efetividade do selante. Em tal situação, o sistema adesivo à base de álcool, utilizado como uma camada intermediária entre o selante e o esmalte deveria ser utilizado por poder conduzir a evaporação da água na superfície oclusal, após a lavagem do ácido, o que pode resultar numa melhor adaptação do selante. Assim, os resultados obtidos no estudo de Hevinga *et al.*, 2007, mostraram que a aplicação de um sistema adesivo previamente ao selamento de fissuras cariadas após contaminação com água reduziu significativamente a microinfiltração e aumentou a profundidade de penetração do selante. A aplicação de um sistema adesivo após contaminação com saliva ou combinação desta e do ar de secagem não revelaram diferenças significativas de infiltração, pois mesmo com a secagem de um adesivo a base de álcool, os peptídeos da saliva podem impedir adaptação apropriada do selante ao esmalte preparado, porém, a profundidade de penetração do selante aumentou significativamente.

Entretanto, outros estudos realizados em fissuras sadias mostraram que o uso de um adesivo anterior ao selamento após contaminação com saliva reduziu significativamente a microinfiltração (Hebling & Feigal, 2000; Borsatto *et al.*, 2004). Celiberti & Lussi, 2007, compararam a profundidade de penetração e o nível de microinfiltração de selantes aplicados em fissuras sadias com aquele em que os selantes foram aplicados em fissuras com lesões cáries artificiais e naturais em esmalte. Os resultados mostraram que a microinfiltração do selante foi significativamente influenciada pela condição do esmalte (sadio, lesão cáries artificial ou natural em esmalte) sendo que a lesão natural em esmalte mostrou maior valor de microinfiltração do que em esmalte sadio ou lesão cáries artificial e a localização da lesão de cárie.

Comparado ao selamento de fissuras cáries, o selamento de fissuras sadias mostrou-se mais eficaz na obtenção de selamento adequado e melhor profundidade de penetração do material selador (Hevinga *et al.*, 2007).

Vários estudos têm demonstrado que as lesões de cárie artificiais podem ser penetradas pelo menos parcialmente, com adesivos e selantes de fissuras comercialmente disponíveis (Davila *et al.*, 1975; Rodda, 1983; Gray & Shellis, 2002; Schmidlin *et al.*, 2004; Meyer-Lueckel *et al.*, 2006), o que resulta na redução da progressão da lesão em ambiente cariogênico (Davila *et al.*, 1975; Robinson *et al.*, 1976, 2001; Goepferd & Olberding, 1989; Donly & Ruiz, 1992; Paris *et al.*, 2006). Porém, como uma tentativa de interceptar a lesão, Meyer-Lueckel & Paris, 2008, observaram que mesmo o adesivo que apresentou uma boa capacidade de penetração dentro do corpo da lesão (Excite® - Vivadent) ainda apresentou menor valor de penetração quando comparado a infiltrantes experimentais.

Sendo assim, outros materiais que tem sido desenvolvidos recentemente com o propósito de penetrar e paralisar a progressão da lesão de cárie são as resinas fotopolimerizáveis de baixa viscosidade, denominadas “infiltrantes” (Paris *et al.*; 2007).

Em contraste com o selamento, onde uma camada superficial do material é aplicada, a infiltração de resina de baixa viscosidade visa estabelecer

uma barreira de difusão dentro do corpo da lesão de cárie. Isso pode ter várias vantagens, como a facilidade de aplicação e a proteção às margens do selante. No entanto, a praticidade superior e eficácia clínica do tratamento de infiltração ainda precisam ser demonstradas; portanto, ensaios clínicos controlados foram iniciados tanto em lesões artificiais como em naturais. (Meyer-Lueckel e Paris, 2008).

Há grandes diferenças estruturais entre os tipos de lesão de cárie em esmalte, *in vitro* e *in vivo*, apresentando-se principalmente na camada superficial. Devido à alternância de ciclos de des-remineralização na cavidade oral, as camadas superficiais de lesões naturais, obviamente, são heterogêneas e podem apresentar maior teor de minerais em relação às lesões artificiais. Para a camada superficial das lesões artificiais de esmalte, espessura média de 15-30 μm (Silverstone, 1968; Kielbassa *et al.*, 2005) e teor de minerais de 63-76% vol (Kielbassa *et al.*, 2005) têm sido relatados. Em contrapartida, nas lesões *in vivo*, uma espessura média de 40 μm e conteúdo mineral de 83% foram observados na camada superficial (Bergman & Lind, 1966). Dessa maneira, não é aplicável a transferência de resultados obtidos em lesão artificiais e naturais (Meyer-Lueckel & Paris, 2008).

Além disso, lesões naturais diferem de lesões artificiais não só com relação à espessura e porosidade da camada superficial, mas também sobre a histologia do corpo da lesão (Meyer-Lueckel & Paris, 2008).

Durante o desenvolvimento das lesões iniciais de cárie natural em esmalte, pode-se observar em microscopia de luz polarizada a presença de quatro zonas histológicas típicas: 1- Zona superficial: camada relativamente intacta (20 a 50 μm de espessura), de aspecto normal, com perda mineral de aproximadamente 1%; clinicamente a superfície aparece inalterada; 2- corpo da lesão: é a zona mais ampla e com maior índice de desmineralização; região que apresenta a maior porcentagem de volume de poros, chegando a apresentar perdas de mineral de até 50%; 3- Zona escura: a qual é passível de visualização quando o meio de embebição é a quinolina, observando-se nesta região, gradual diminuição das

perdas minerais; 4- Zona translúcida: sua presença não é comum em todas as lesões, sendo a perda mineral nesta camada de 1%, representa a frente de avanço da lesão de cárie, sua espessura varia de 5 a 100 μm . Apesar de possuir uma superfície relativamente intacta, as lesões iniciais de cárie em esmalte possuem a superfície 10 a 50 vezes mais porosas que o esmalte sadio (Silverstone, 1973; Fejerskov & Kidd, 2003).

O diâmetro dos poros dentro das lesões não é comparável nas diferentes zonas da lesão (Silverstone, 1973). Assim, a velocidade de penetração pode variar em diferentes profundidades de lesão. Portanto, uma correlação linear entre o coeficiente de penetração (CP) e a profundidade de penetração em lesões artificiais ou naturais subsuperficiais não é susceptível de ser encontrado. No entanto, o CP pode fornecer uma indicação para a ação capilar, induzindo a penetração da resina nas lesões.

A infiltração das lesões do esmalte é impulsionada principalmente pelas forças capilares. Conseqüentemente, ambos o volume de poros e o raio capilar do sólido a ser penetrado sofrem forte influência da infiltração de resina. Portanto, a camada superficial pode dificultar a penetração da resina por causa de seu volume de poros relativamente baixo. Nestes casos, o condicionamento ácido pode perfurar ou até mesmo remover a camada superficial e, assim, aumentar infiltração da resina no corpo da lesão (Meyer-Lueckel & Paris, 2007).

No uso de materiais adesivos no esmalte dentário, o condicionamento ácido da superfície é imprescindível para a criação de uma superfície porosa produzida pela desmineralização para que os monômeros possam permear os poros e formar prolongamentos resinosos e o embricamento micromecânico da restauração com a estrutura do esmalte. Remoção de partes da camada de superfície por ataque ácido tem sido considerada uma opção para aumentar a porosidade da superfície a fim de tornar a base do corpo da lesão acessível para íons minerais (Hicks & Silverstone, 1984; Larsen & Pearce, 1992).

De acordo com Gray & Shellis, 2002, em lesões artificiais, o condicionamento ácido dessa superfície com ácido fosfórico a 37% aumentou a penetração da resina.

No entanto, estudos mostraram que uma mesma profundidade de infiltração não pode ser alcançada em cárie natural, utilizando os protocolos de tratamento idêntico ao de lesões artificiais, devido às diferenças estruturais entre lesões artificiais e naturais já citadas anteriormente (Meyer-Lueckel & Paris, 2007).

A camada de superfície da cárie em esmalte também pode ser eliminada mecanicamente, por exemplo, por meio de broca diamantada, polimento ou tira de lixa (Croll, 1986). No entanto, esse procedimento pode ocluir os poros da lesão com uma camada de esfregaço (*smear layer*) e o grau de redução da superfície seria de difícil controle, especialmente no espaço proximal (Meyer-Lueckel & Paris, 2007). Já com ataque ácido, a redução da camada superficial pode ser controlada.

Meyer-Lueckel *et al.*, 2007, avaliaram o efeito do ataque ácido de um gel de ácido fosfórico a 37% comercialmente disponível e dois géis de ácido clorídrico experimentais, de 5 e 15%. O ácido fosfórico tem sido amplamente utilizado em concentrações de 30-40% para o condicionamento do esmalte e dentina em odontologia. Estudos anteriores mostraram redução da camada superficial do esmalte anterior a infiltração com resinas artificiais nas lesões (Gray & Shellis, 2002; Meyer-Lueckel *et al.*, 2006; Paris *et al.*, 2006), e para fins de "selamento" de lesões naturais de esmalte (Martignoni *et al.*, 2006), após o condicionamento com ácido fosfórico a 37%.

O ácido clorídrico tem sido aplicado em odontologia estética para remover alterações de cor ou manchamentos superficiais, por microabrasão do esmalte em concentrações semelhantes às do estudo de Meyer-Lueckel, 2007. (McCloskey, 1984; Croll & Cavanaugh, 1986; Mathewson *et al.*, 1987).

Os resultados obtidos por Meyer-Lueckel, 2007, revelaram que o gel de ácido fosfórico a 37% não é adequado para remover a camada superficial de lesões naturais quando aplicado por 30-120 segundos, em contraste com

tratamento com o gel de ácido clorídrico a 15% por 90-120 segundos que levou a uma quase completa remoção da camada superficial e, portanto, parece ser mais adequado para o pré-tratamento das lesões naturais de esmalte antes da infiltração de resina. Entretanto, como descrito anteriormente, o condicionamento da camada superficial realizado com ácido fosfórico a 37% mostrou ser mais adequado para preparar lesões artificiais para a infiltração com resina de baixa viscosidade do que o condicionamento com ácido clorídrico a 15% (Gray & Shellis, 2002). Além disso, pode-se ressaltar que a remoção da camada superficial pode enfraquecer a estrutura da lesão (Meyer-Lueckel & Paris, 2007). Os valores da erosão da superfície após o condicionamento com ácido fosfórico observados neste estudo estão em conformidade com outros reportados anteriormente, onde o esmalte sadio (Hermsen & Vrijhoef, 1993) ou lesões artificiais (Hicks *et al.*, 1984) foram condicionadas.

A remoção ou perfuração da camada superficial foi vista ser essencial para uma boa infiltração do material no corpo da lesão. No entanto, mesmo com este método de condicionamento, o adesivo Excite (IvoclarVivadent, Schaan, Liechtenstein) penetrou em média, apenas 58 μm em lesões naturais (Paris *et al.*, 2007), mostrando que este material não é adequado para a infiltração.

Para melhorar a capacidade de penetração da resina, foram avaliadas diversas misturas monoméricas que diz respeito ao seu coeficiente de penetração (CP) (Paris *et al.*, 2007). Um estudo recente investigou a influência do coeficiente de penetração (CP; equação 1) de resinas experimentais de baixa viscosidade fotopolimerizáveis e o tempo de aplicação na profundidade de penetração (Paris *et al.*, 2007). O coeficiente de penetração faz parte da equação de Washburn (equação 2), que descreve a penetração de líquidos (resinas fotopolimerizáveis) em poros sólidos (lesões de esmalte) conduzido por forças capilares (Fan *et al.*, 1975; Buckton, 1995). A boa correlação entre a profundidade de penetração e a raiz quadrada do produto do CP e o tempo de aplicação pode ser mostrada (equação 3) (Meyer-Lueckel & Paris, 2008). A equação de Washburn é descrita pelas fórmulas:

$$PC = \left(\frac{\gamma \cdot \cos\theta}{2\eta} \right) \quad (1)$$

$$d^2 = \left(\frac{\gamma \cdot \cos\theta}{2\eta} \right) r \cdot t \quad (2)$$

$$d \sim \sqrt{PC \cdot t} \quad (3)$$

Onde d = distância movida pela resina líquida; θ = ângulo de contato da resina líquida (com o esmalte); γ = tensão superficial da resina líquida (com o ar); η = viscosidade dinâmica da resina líquida; t = tempo de penetração; r = raio de capilaridade (poro).

Assim, Paris *et al*, 2007, concluíram em seu estudo que as resinas com maiores CPs penetraram lesões artificiais de esmalte significativamente mais rápido em comparação com um adesivo comercialmente disponível ou com misturas apresentando CPs menores. Além disso, Meyer-Lueckel & Paris, 2008, observaram que a profundidade de penetração esteve também fortemente correlacionada com a capacidade de um material em dificultar a progressão da lesão. Em particular, a utilização de misturas monoméricas com CPs > 200 cm/seg (infiltrantes) parece ser preferível para a infiltração de cárie, como sugerido a partir destes estudos de lesões artificiais (Meyer-Lueckel & Paris, 2008).

O monômero mais comumente utilizado como base da matriz resinosa de compósitos é o BisGMA (bisfenol A diglicidil metacrilato) (Fig. 1), por possuir alto módulo e temperatura de transição vítrea, baixa volatilidade, e contração de polimerização relativamente baixa. O BisGMA é altamente viscoso quando não polimerizado e devido ao seu alto peso molecular, promove baixa contração de polimerização e rápido endurecimento, e o polímero resultante é caracterizado por qualidades mecânicas superiores (Peultzfeldt, 1997). No entanto, a viscosidade extremamente alta do BisGMA requer a diluição com um monômero de baixa viscosidade para se obter uma melhor manipulação, uma maior capacidade de se agregar carga e uma maior extensão de polimerização. Os dois anéis aromáticos volumosos no espaçador também tornam esse monômero bastante rígido. Essa

propriedade tem um efeito negativo na taxa de conversão, uma vez que grupos metacrilatos terão dificuldade em se unir a outro grupo metacrilato. O BisGMA também é capaz de promover forte ligação de hidrogênio através do seu grupo hidroxil. Sua estrutura rígida favorece as ligações intermoleculares mais que as interações intramoleculares (Lemon *et al.*, 2007) e também restringe a mobilidade, a qual é função de seu alto peso molecular (Dickens *et al.*; 2003; Sideridou *et al.*; 2002). Sendo assim, monômeros de baixo peso molecular são requeridos para não comprometer a polimerização. Substitutos do BisGMA como bisfenol A dimetacrilato etoxilato (BisEMA: PM: 540 g mol⁻¹; $\eta=3$ Pa s) (Fig. 1) e o uretano dimetacrilato (UDMA: PM=470 g mol⁻¹) (Fig. 1) são encontrados em alguns produtos comerciais a fim de diminuir a viscosidade do produto final (Ferracane, 2001).

O BisEMA é um monômero que possui a estrutura similar a do BisGMA, exceto pelo fato de que os grupos hidroxil não estão presentes, sendo assim, seus valores de viscosidade são menores com relação ao BisGMA, evidenciando a importância da ligação de hidrogênio em determinar a viscosidade (BisEMA: $\eta=3$ Pa s; BisGMA: $\eta=600=1000$ Pa s) (Gonçalves *et al.*, 2009).

Outro monômero frequentemente usado como matriz para os compósitos é o UDMA, que também possui baixa viscosidade e é friável (Soderpolin, Mariotti, 1999). Ele tem sido utilizado sozinho ou em combinação com outros monômeros tais como BisGMA e TEGDMA (Floyd *et al.*; 2006; Khatri *et al.*, 2003). Resultados de estudos *in vitro* indicam que compósitos a base de UDMA tem propriedades mecânicas melhoradas comparado com compósitos a base de BisGMA. Além disso, há indicações de que os maiores graus de conversão são obtidos com UDMA quando comparado às misturas de BisGMA:TEGDMA (Gaurav Vasudeva, 2009). As vantagens de UDMA são: menor viscosidade, quando comparado ao BisGMA e a presença de ligações uretano altamente flexíveis, as quais podem melhorar a rigidez de compósitos a base deste monômero (Asmussen *et al.*, 1998; Stansbury *et al.*, 2001). A molécula de UDMA, com seu núcleo alifático flexível e duas ligações de uretano, é também capaz de formar

pontes de hidrogênio, é menor em tamanho e portanto, tem uma maior concentração de duplas ligações (Barszczewska-Rybarek, 2009).

TEGDMA (Fig. 1) (trietileno glicol dimetacrilato) ou HEMA (Fig. 1) (2-hidroxietil metacrilato) são utilizados como monômeros diluentes (Labella & Davy, 1998).

O TEGDMA possui o menor tamanho e a maior concentração de duplas ligações. Assim, ele deve exibir a maior densidade de ligação cruzada e ser capaz de formar as redes mais firmes (Barszczewska-Rybarek, 2009). Por ser um monômero de menor peso molecular (baixa viscosidade), ele reduz a viscosidade do BisGMA, quando misturados, aumenta a ligação cruzada e a dureza do material (Soderpolin, 1999). O HEMA não polimerizado apresenta-se como fluido que é bem solúvel em água, etanol e/ou acetona (Pashley *et al.*, 1998). Possui característica hidrófila e é frequentemente aderido aos adesivos, não apenas para assegurar o bom molhamento, mas também por causa de sua natureza como solvente (Van Landuyt *et al.*, 2005) . Além disso, o HEMA possui papel de diluente devido ao menor tamanho de sua molécula e promove a infiltração da resina ao substrato devido a sua condição hidrófila (Collares *et al.*, 2007).

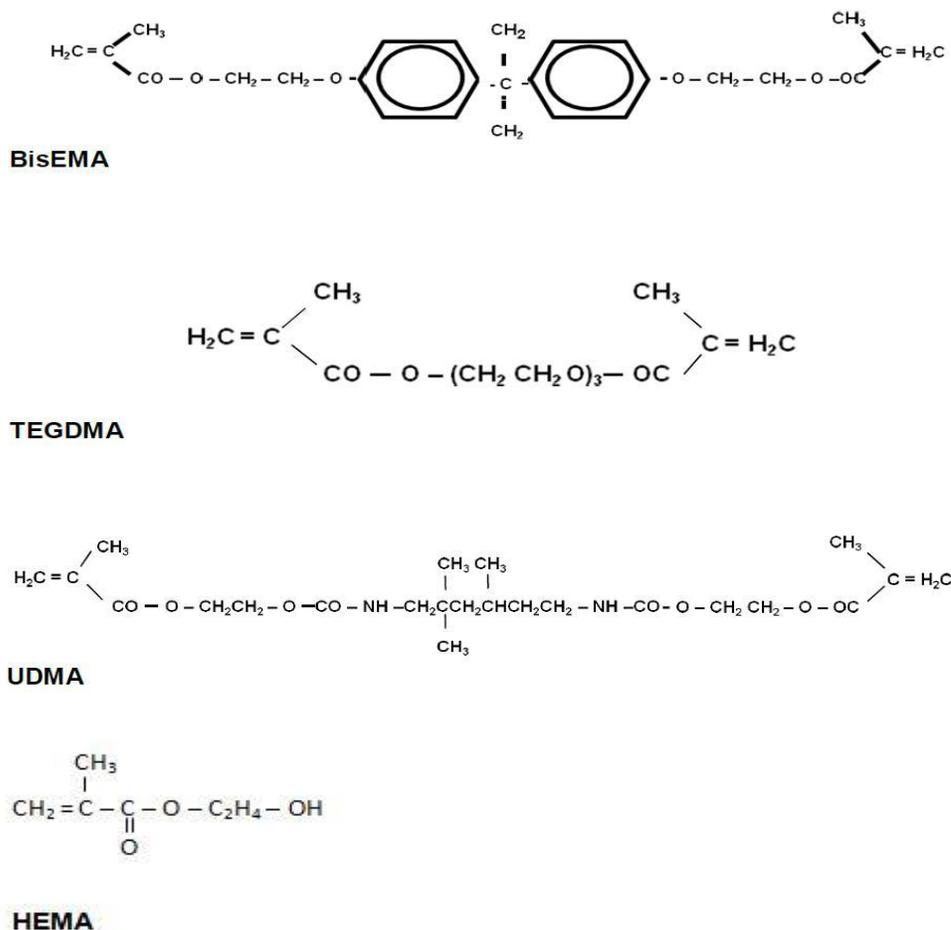


Figura 1. Estrutura química dos monômeros BisEMA, TEGDMA, UDMA e HEMA.

Como relatado por Paris *et al.*, 2007, os materiais resinosos experimentais obtiveram maiores valores de CP a partir de mistura com elevados teores de HEMA, TEGDMA e etanol. Isto é importante devido à menor viscosidade e ângulos de contato produzidos pelos componentes da mistura. Em contraste, a incorporação de BisGMA e UDMA aumentaram a viscosidade e diminuíram o CP do material. Portanto, o baixo ângulo de contato e a baixa viscosidade parecem ser fatores de promoção do potencial dos agentes infiltrantes, bem como o tipo de monômero utilizado.

No entanto, apesar do alto CP, as resinas compostas contendo altas parcelas de HEMA e etanol mostraram polimerização imperfeita. Conseqüentemente, a quantidade de HEMA no potencial de infiltração de resinas compostas é limitada. Resinas a base de TEGDMA contendo 10% ou 20% de etanol apresentaram alto CP e polimerização satisfatória. Assim, estas misturas de resina podem ser promissoras para a rápida penetração do material no corpo da lesão de cárie em esmalte (Paris *et al.*, 2007).

Entretanto, é provável que a profundidade de penetração por si só não seja o único fator preditor para a progressão das lesões infiltradas em um ambiente desmineralizante. Outras características como a estabilidade à hidrólise ou homogeneidade da infiltração da resina podem influenciar a impermeabilidade da camada de resina e, portanto, a resistência das lesões seladas a ataques cariogênicos (Meyer-Lueckel & Paris, 2008).

Por outro lado, heterogeneidades têm sido relatadas previamente (Paris *et al.*, 2006) e podem ser causadas pela contração de polimerização, evaporação incompleta de solvente, ou inibição de oxigênio. Estudos anteriores mostraram que a aplicação repetida de resina pode reduzir estas porosidades e, portanto, diminuir ainda mais a progressão da lesão (Robinson *et al.*, 2001; Mueller *et al.*, 2006).

Paris & Meyer-Lueckel, 2010, concluíram em um estudo prévio, que resinas de baixa viscosidade (infiltrantes) principalmente a base de TEGDMA apresentando um coeficiente de penetração relativamente alto (>200 cm/seg) foram capazes de inibir quase que completamente a progressão de lesões de cárie naturais em esmalte em um meio desmineralizante.

Além disso, Meyer-Lueckel *et al.*, 2006, avaliaram a influência do tempo de aplicação na penetração dos adesivos Heliobond, Resulcin Monobond, Excite, Solobond M e Adper Prompt L Pop, assim como no selante Helioseal, comparando tempos de aplicação de 15s e 30s, concluindo que o tempo de aplicação de 30 segundos deve ser usado para otimizar o selamento da lesão resultando em profundidades de penetração maiores e camadas resinosas mais compactas.

Entretanto, Meyer-Lueckel & Paris (2008, 2010) utilizaram tempos de aplicação de 1 min e 5 min dos materiais na superfície da lesão de cárie artificial em esmalte, adquirindo profundidade de penetração relevante do material. Sendo assim, esta diminuição do tempo (30 s) de aplicação favorece o menor tempo clínico mostrando a mesma eficácia da profundidade de penetração dos materiais nas lesões iniciais de cárie.

Paris *et al.*, 2007, compararam vários produtos disponíveis comercialmente como selante (Heliobond) e adesivos (Adper Prompt L Pop, Excite, Heliobond, Resulcin Monobond, Solobond M), e 66 resinas experimentais contendo dois dos monômeros BisGMA, UDMA, TEGDMA e HEMA em proporções de peso variáveis cada, tanto quanto o etanol (0%, 10% e 20%). Como resultados, eles obtiveram que os produtos comercialmente disponíveis contendo solventes como acetona (Solobond M), etanol (Excite), e água (Adper Prompt L Pop) mostraram menor tensão superficial e viscosidades comparado com os materiais sem solvente. Os materiais contendo solventes também mostraram os maiores coeficientes de penetração. Para os materiais resinosos experimentais, os resultados mostraram que as maiores diferenças entre as resinas foram encontradas em relação à viscosidade.

Cinco resinas experimentais contendo altas quantidades de BisGMA ou UDMA apresentaram-se muito viscosas para serem medidas com dispositivos disponíveis. A adição de etanol diminuiu a viscosidade, tensão superficial e ângulo de contato de todas as combinações, levando ao aumento do CP para todas as combinações de monômeros. O maior CP foi encontrado para os compósitos contendo TEGDMA, HEMA e 20% de etanol. Os compósitos contendo altas quantidades de HEMA e etanol não polimerizaram suficientemente, produzindo materiais líquidos ou borrachóides (Paris *et al.*, 2007).

Após terem sido realizados vários estudos analisando a composição de resinas de baixa viscosidade experimentais, recentemente, foi lançado no mercado, o infiltrante Icon (DMG; Hamburg, Germany), com o objetivo de penetrar nas lesões iniciais de cárie em esmalte em superfícies livres e interproximais.

Paris *et al.*, 2010, concluíram em seu estudo *in situ*, que a infiltração de cárie incipiente utilizando este material (Icon, DMG; Hamburg, Germany), é um método eficaz de inibir a posterior desmineralização das superfícies designadas para o tratamento, sob condições altamente cariogênicas. Entretanto, mais estudos que mostrem a eficácia destes materiais infiltrantes em lesões iniciais de cárie em esmalte de superfície oclusal são necessários.

Frente aos vários tipos de materiais seladores disponíveis no mercado, atualmente, pesquisas têm sido realizadas a fim de avaliar a resistência de união destes materiais na estrutura dentária. Trabalhos laboratoriais, incluindo avaliação de micro infiltração marginal (Gillet *et al.*, 2002; Perry & Rueggeberg, 2003; Perez *et al.*, 2003; Hanning & Grafe, 2004), retenção dos selantes e a proteção à cárie dentária (Pereira *et al.*, 2001; Aranda & Garcia-Godoy, 1995, Futatsuki *et al.*, 2001; Áudio-Gold, 2002; Feigal & Quelhas, 2003), mensuração da resistência de união do material selador à superfície do esmalte através de testes de cisalhamento (el-Kalla & Garcia-Godoy, 1998; Perez-Lajarin *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2003), testes de tração (Torii *et al.*, 2002) e testes de microtração, avaliação da retenção dos selantes através de microscopia eletrônica de transmissão (Tay, 2004) têm sido utilizados.

Entretanto, outra técnica introduzida na Odontologia desde 1987 que tem sido utilizada para visualizar as estruturas de união de materiais restauradores ao substrato dentário é a microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). Através da incorporação de corantes fluorescentes aos materiais a serem analisados como, por exemplo, primer, adesivo, material selador e infiltrantes, as amostras, sem necessidade de desidratação, são visualizadas neste tipo de microscopia que permite avaliar a profundidade de penetração de cada material específico ao substrato dentário (Imazato *et al.*, 2002) pela visualização da separação cromatográfica da mistura de corante ao material durante a penetração.

De acordo com a literatura, algumas técnicas de incorporação de corantes fluorescentes aos materiais são consideradas tais como a técnica de pigmentação direta, técnica de pigmentação indireta (Paris *et al.*, 2009), Resina

de Spurr (Spurr, 1969) e utilização de apenas um fluoróforo (Meyer-Lueckel, 2008).

Através da técnica de pigmentação direta, o material infiltrante é impregnado com o fluoróforo vermelho isotiocianato de rodamina B a 0,1% (RITC B 0,1%, Sigma Aldrich, Alemanha) anterior à infiltração, ou seja, esta mistura é realizada antes da aplicação do material no substrato dentário. Em contraste, a técnica de pigmentação indireta ocorre pela impregnação do fluoróforo vermelho isotiocianato de rodamina B a 0,1% ao corpo da lesão, primeiramente, ou seja, os espécimes são armazenados em solução etanólica de RITC B 0,1% por 12 h. Subsequentemente, os espécimes são secos usando ar comprimido por 10 s e o infiltrante puro é aplicado sobre a superfície da lesão. A fim de remover o fluoróforo vermelho que não foi aderido pelo infiltrante, os espécimes são armazenados em solução de peróxido de hidrogênio por 12 h a 37°C, seguido de lavagem com água por 60 s. Em ambas as técnicas, após o preparo dos espécimes com o fluoróforo vermelho RITC B 0,1%, estes são imersos em solução etanólica a 50% de sal de fluoresceína de sódio 100 µM (NaFl 100 µM, Sigma Aldrich, Alemanha), por 3 min, seguido de lavagem com água deionizada por 10 s, para posterior visualização em Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL, Leica TCS NT; Leica) através do modo de fluorescência dual (DF), onde ambas as fluorescências de RITC B 0,1% e NaFl 100 µM são detectadas simultaneamente (Paris *et al.*, 2009).

Em um estudo realizado por Meyer-Lueckel & Paris, 2008, eles utilizaram apenas um tipo de fluoróforo (sal de fluoresceína de sódio 100 µM, NaFl, Sigma Aldrich) para a impregnação do corante no corpo da lesão, deixando os espécimes imersos em solução etanólica 50% contendo fluoresceína de sódio 100 µM, por 10 min, seguido de lavagem em água deionizada por 3 min, e posterior visualização em MCVL, através do modo de fluorescência.

A Resina de Spurr é um tipo de resina epóxi de baixa viscosidade que também pode ser utilizada para a análise em MCVL. Em estudos anteriores, os espécimes foram preparados, os quais a aplicação dos materiais a serem

estudados foi feita anterior à utilização da resina de Spurr. Posteriormente, a resina de Spurr foi impregnada com o RITC B 0.1%, colocada sobre os espécimes e deixada em autoclave a 70°C por 8h para sua polimerização. Sob esta pressão, a resina de baixa viscosidade (Spurr) penetra dentro dos poros remanescentes da lesão a fim de se obter sua imagem em MCVL (Meyer-Lueckel *et al.*, 2006).

Em estudo prévio realizado, Paris *et al.*, 2009, compararam a efetividade das técnicas de manchamento direta e indireta, concluindo que a técnica indireta foi mais confiável e precisa do que a direta. Entretanto, em todas as técnicas utilizadas, foi possível visualizar a penetração dos materiais dentro do corpo da lesão, para posterior análise da profundidade de penetração em MCVL. Dessa forma, o critério de seleção da técnica deve ser feito de acordo com estudos pilotos que mostrem a validação da técnica selecionada, dentro das limitações de cada estudo, sendo que o seccionamento e armazenamento dos espécimes, em todas as técnicas que utilizam a rodamina B, deve ser feito em óleo vegetal, pois estudos prévios demonstraram que a lixiviação da rodamina B impregnada em um adesivo comercial (Adper Single Bond, 3M ESPE), que contem os monômeros BisGMA e HEMA, e os solventes água e etanol, foi quase indetectável após uma semana de armazenamento em óleo vegetal (0,004%), quando comparado com o armazenamento em água destilada (1,77%) ou em etanol (49%) (D'Alpino *et al.*, 2006).

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar pela Microscopia Confocal de Varredura a Laser, a penetração de materiais resinosos experimentais em lesões artificiais subsuperficiais de cárie em esmalte (LASCE).

A hipótese testada nesse experimento é de que diferente monômero de base (TEGDMA) e co-monômeros (BisEMA, UDMA) associados ao diluente HEMA e ao solvente etanol, em várias concentrações, produzem diferentes graus de penetração nas lesões iniciais de cárie em esmalte oclusal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção e preparo dos dentes

Cinquenta e cinco terceiros molares inclusos foram selecionados (Figura 2 A) após o consentimento e doação pelos pacientes e a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, protocolo nº 046/2006. Os dentes foram armazenados em solução de timol 0,5%, logo após a extração, até o momento do processamento, por um período máximo de 2 meses.

As faces oclusais dos dentes foram limpas com escovas Robinson e pasta profilática (pedra pomes e água) utilizando micromotor em baixa rotação (Figura 2 B). Posteriormente, as coroas foram seccionadas 1 mm além da junção cimento-esmalte, com disco diamantado de dupla face (Extec, Enfield, CT, USA) numa cortadeira metalográfica Isomet 1000 (Figura 2 C), a velocidade de 300 rpm, sob irrigação de água, para obtenção dos fragmentos coronários. Os dentes foram fixados em placa de acrílico com cera pegajosa para o corte e descarte das raízes, de forma que a junção cimento-esmalte ficasse perpendicular à placa acrílica. Os fragmentos coronários foram recobertos por 2 camadas de verniz ácido resistente (esmalte vermelho Colorama[®], São Paulo, Brasil), deixando uma janela de exposição de 5X5 mm na face oclusal (Figura 2 D), para posterior produção das lesões artificiais, subsuperficiais de cárie no esmalte.

Os fragmentos coronários foram divididos em 2 grupos controle (positivo e negativo) e 9 grupos experimentais (n=5), :

Grupo Controle Positivo (dente hígido)

Grupo Controle Negativo (dente cariado)

Grupo 1: 100% TEGDMA

Grupo 2: 80% TEGDMA + 20% etanol

Grupo 3: 80% TEGDMA + 20% HEMA

Grupo 4: 25% UDMA + 75% TEGDMA

Grupo 5: 20% UDMA + 60% TEGDMA + 20% etanol

Grupo 6: 20% UDMA + 60% TEGDMA + 20% HEMA

Grupo 7: 25% BISEMA + 75% TEGDMA

Grupo 8: 20% BISEMA + 60% TEGDMA + 20% álcool

Grupo 9: 20% BISEMA + 60% TEGDMA + 20% HEMA

O sistema de fotoiniciação foi composto por 0,5% de Canforoquinona, 1% amina e 0,1% BHT foi utilizado.

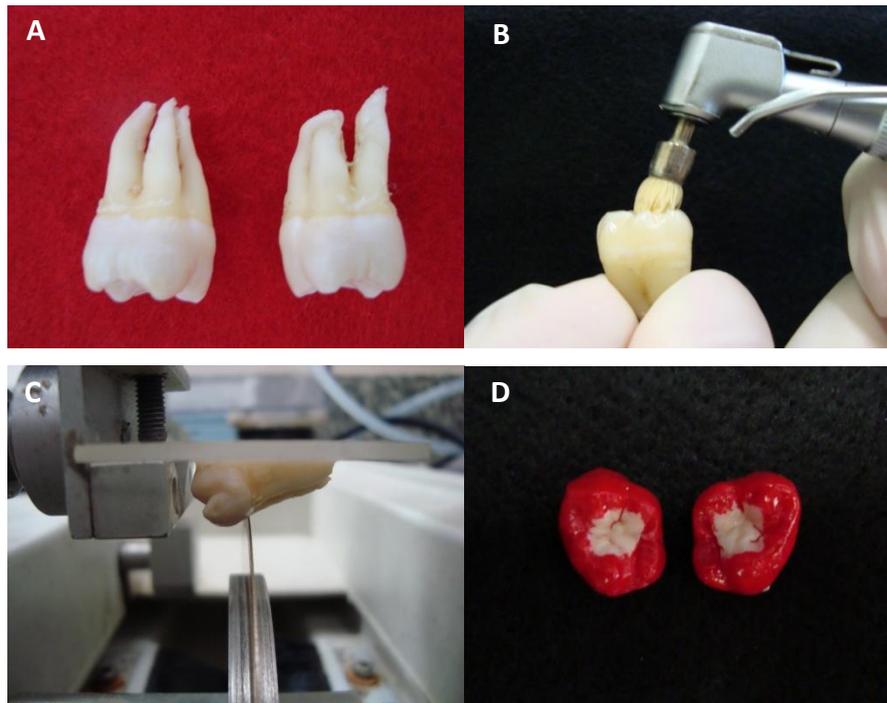


Figura 2. (A) Seleção dos dentes; (B) Profilaxia com escova Robinson e pasta profilática; (C) Corte da raízes para obtenção de fragmentos coronários; (D) Fragmentos coronários cobertos com duas camadas de verniz ácido resistente.

4.2 Produção das lesões artificiais sub-superficiais de cárie em esmalte e obtenção das secções do grupo controle negativo

Lesões artificiais sub-superficiais de cárie em esmalte (LASCE) foram produzidas na superfície oclusal de esmalte sadio dos fragmentos coronários de todos os grupos, exceto para o grupo controle positivo (dente hígido). Como descrito anteriormente, as amostras foram recobertas por 2 camadas de verniz ácido resistente (esmalte vermelho Colorama[®]), deixando uma janela de exposição de 5 X 5 mm na face oclusal. A desmineralização ocorreu nesta região (janela exposta) através do contato entre superfície do esmalte/solução de cárie.

Para produzir a LASCE por este modelo, cada fragmento coronário foi mantido individualmente em 50 mL (2,0 mL/mm² de esmalte exposto) de solução tampão acetato 0,05 M, pH 5,0, 50% saturada em relação a hidroxiapatita, durante 10 h a 37°C (Paes Leme *et al.*, 2003). O período de exposição foi determinado em estudo piloto com a análise de microscopia de luz polarizada que evidenciou, no esmalte dentário estudado, a presença de LASCE. A concentração de cálcio na solução foi de 66,3 µg/ mL, sendo determinada pela espectrometria de absorção atômica com chama em espectrofotômetro modelo 506 (Perkin Elmer). A concentração de fósforo foi de aproximadamente 32 µg/mL sendo determinada pelo método colorimétrico de Fiske e Subbarow (1925) em espectrofotômetro modelo 800M (Analyser) ajustado a 660 nm.

Após a produção da LASCE na superfície oclusal, os fragmentos coronários do grupo controle negativo (dente cariado) foram seccionados longitudinalmente no sentido ocluso-cervical com intervalos de corte de 0.5 mm, em cortadeira Isomet 1000, a velocidade de 150 rpm, seguido de polimento com lixas abrasivas de granulação 600, 1200 e 2000, sob irrigação com água, para obtenção de secções com espessura média de 100 µm, posteriormente polidas com pasta diamantada, e deixadas por 10 min em ultrassom com água deionizada para a remoção de resíduos. Este procedimento foi realizado para posterior visualização da LASCE em microscopia de luz polarizada

4.3 Confeção dos espécimes

Os fragmentos coronários dos grupos 1 a 9 (esmalte cariado infiltrado) foram condicionados com ácido fosfórico a 37% (Magic acid 37% - Vigodent) (Figura 3 A) por 60 s, seguido de lavagem e secagem por 15 s (Meyer-Lueckel, 2007). Em seguida, o material resinoso experimental impregnado com isotiocianato de rodamina B a 0,1% (RITC 0,1%; Sigma Aldrich, Alemanha) foi aplicado sobre a superfície oclusal do fragmento coronário com o auxílio de microbrush (Figura 3 B), e deixado por 60s para a penetração do material, com secagem de 15 s, para remoção do solvente, e então fotoativado por 40 s com luz emitida por lâmpada halógena com irradiância de 470 mW/cm² (Elipar Tri-Light - ESPE America Co., Seefeld 82229, Germany) (Figura 3 C).

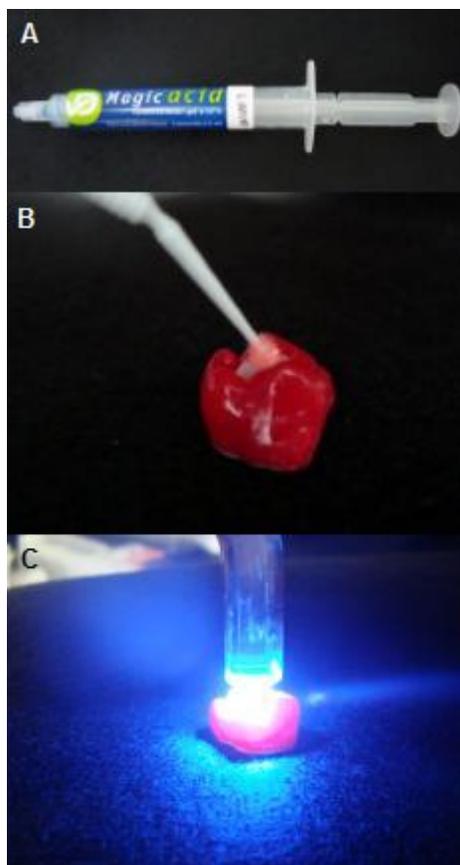


Figura 3. (A) Ácido fosfórico a 37%; (B) Aplicação do material impregnado com RITC 0,1%, com auxílio de microbrush; (C) Fotoativação do material.

Posteriormente, os fragmentos coronários foram fixados com cera pegajosa em placas de acrílico e secções de 0,5 mm de espessura foram confeccionadas a partir do fragmento coronário no sentido ocluso-cervical (Figura 4 A). As secções foram obtidas utilizando-se disco diamantado (Extec, Enfield, CT, USA) montado em cortadeira metalográfica (Isomet 1000, Buehler UK Ltd), a velocidade de 250 rpm. As secções obtidas foram fixadas com cera pegajosa em placa de acrílico (Figura 4 B), e polidas com lixas de granulação 600, 1200 e 2000, sob lubrificação em óleo, a fim de prevenir a dissolução do corante (Oliveira *et al.*, 2010) (Figura 4 C).

Para visualizar as estruturas porosas (partes da lesão não infiltradas) os espécimes foram imersos em solução etanólica a 50% de sal de fluoresceína de sódio a 100 μM (verde) (NaFl; Sigma Aldrich) por 3 min (Figura 4 D). Subseqüentemente, os espécimes foram lavados em água deionizada por 10 s (Paris *et al.*; 2009).

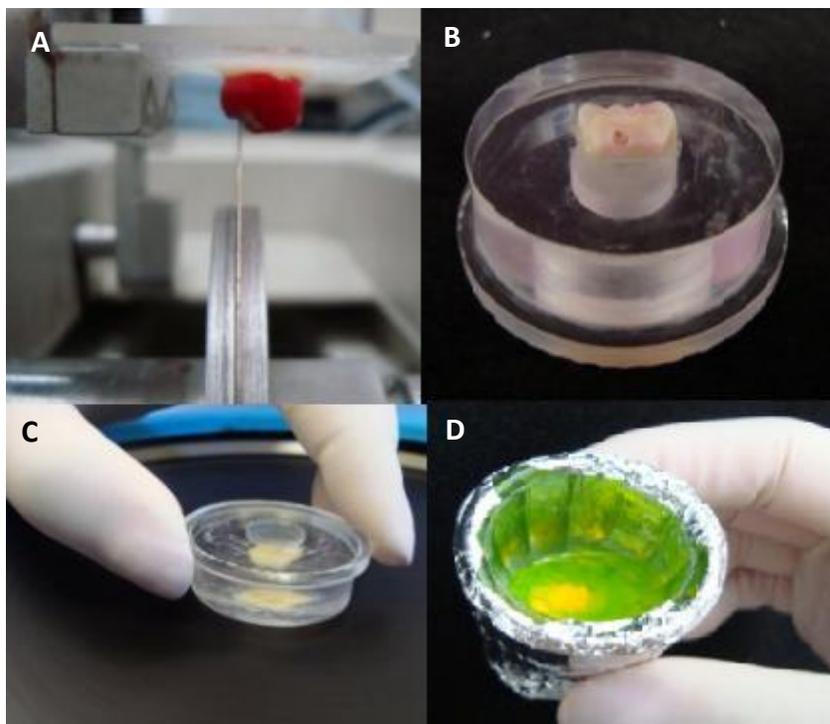


Figura 4. (A) Corte das secções; (B) Secção fixada em placa de acrílico; (C) Polimento da secção; (D) Solução etanólica a 50% de sal de fluoresceína de sódio a 100 μM (NaFl; Sigma Aldrich).

4.4 Análise da profundidade de lesão artificial sub-superficial de cárie em esmalte em Microscopia de Luz Polarizada

A profundidade de LASCE do grupo controle negativo (dente cariado) foi obtida através da análise das secções em microscopia de luz polarizada (Luz Polarizada, LEICA, DMLP) (Figura 5), a qual foi mensurada linearmente (μm) do início ao final da lesão em esmalte em três pontos equidistantes de 300 μm na região de fissura da lesão (Figura 6 A). O cálculo foi realizado através do Microsoft Excel (Microsoft Office Excel 2007) obtendo-se a média geral de profundidade da lesão de 228 μm .

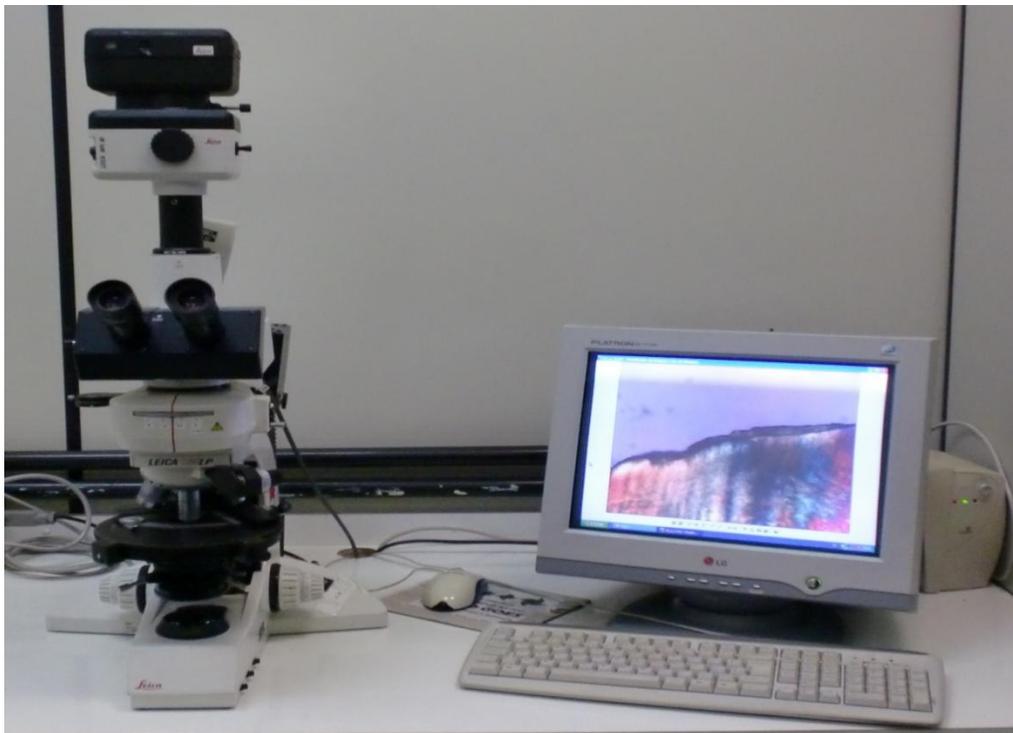


Figura 5. Microscópio de luz polarizada.

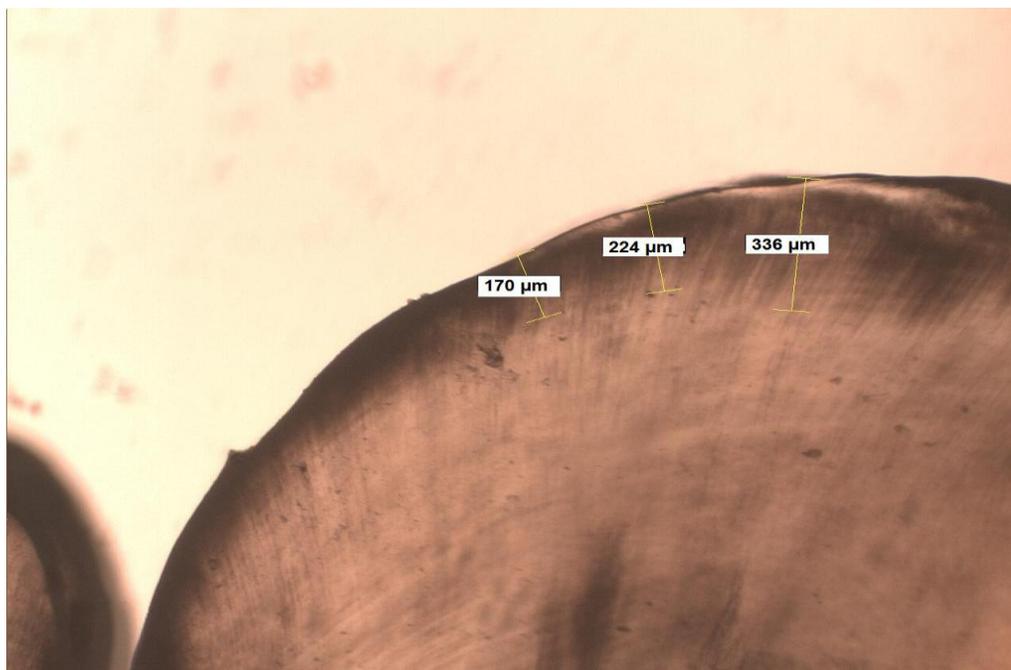


Figura 6. (A) Imagem das medidas realizadas em Microscopia de luz polarizada.

4.5 Análise da profundidade de penetração e adaptação à superfície do esmalte em MCVL

A profundidade de penetração do material na lesão inicial subsuperficial de cárie foi obtida através da análise da intensidade de fluorescência, dada pelo programa LAS AF Lite (MCVL; Leica TCS – SP5), demarcando ambas as colorações vermelha (infiltrante impregnado com RITC 0,1%) e verde (cárie impregnada com NaFl 100 μM), simultaneamente, por meio de MCVL (Figura 7), resultando numa coloração amarela (sobreposição das imagens). Para assegurar que a coloração verde indicou a presença de cárie, e a coloração vermelha, o material infiltrado, um estudo piloto foi realizado a fim de padronizar as imagens adquiridas posteriormente. Sendo assim, um grupo cariado foi deixado em solução etanólica de NaFl 100 μM, por 3 minutos, lavado por 10 s com água deionizada, e em seguida, visualizados em MCVL (Figura 8 A). Outro grupo cariado foi infiltrado apenas com o material resinoso experimental impregnado com RITC B 0,1%,

segundo todos os passos de preparo da amostra, e levado em MCVL para posterior visualização (Figura 8 B).



Figura 7. Microscópio confocal de varredura a laser.

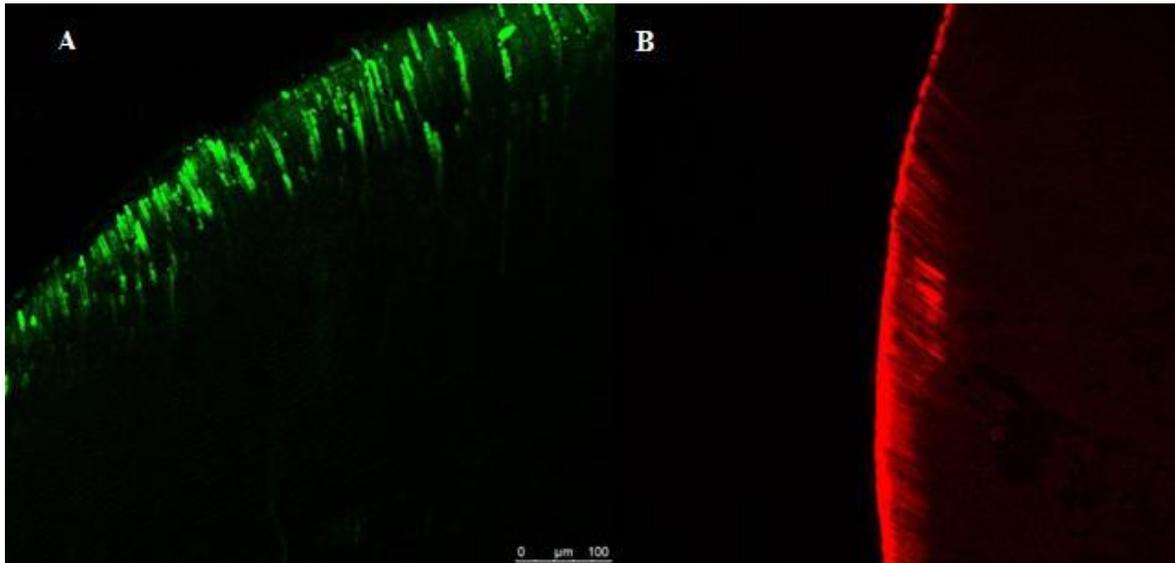


Figura 8. (A) Dente cariado impregnado com NaFI 100 µM; (B) Dente cariado infiltrado com material experimental impregnado com RITC 0,1%.

A coloração amarela indicou que o material infiltrante penetrou nos poros da lesão de cárie (Figura 9). Esta informação foi obtida através da aquisição seqüencial (*between lines*) feita pelo programa LAS AF Lite (MCVL; Leica TCS – SP5) durante o processamento das imagens.

Inicialmente, para a quantificação da intensidade de fluorescência da cárie (coloração verde), as imagens foram submetidas ao programa, que através da seleção das áreas de coloração verde, registraram as médias de intensidade de cada imagem, pelo próprio programa. Em seguida, esta quantificação foi realizada nas mesmas áreas em que foram medidas a cárie, porém, medindo-se a coloração amarela (material infiltrante penetrado na cárie), para posterior avaliação da quantidade de penetração do material dentro da lesão.

A padronização foi realizada pela seleção de imagens adquiridas através de projeção máxima, a qual é obtida durante o processamento de imagens em série (Z-Stack), e indica o maior grau de intensidade de fluorescência dentro do espécime.

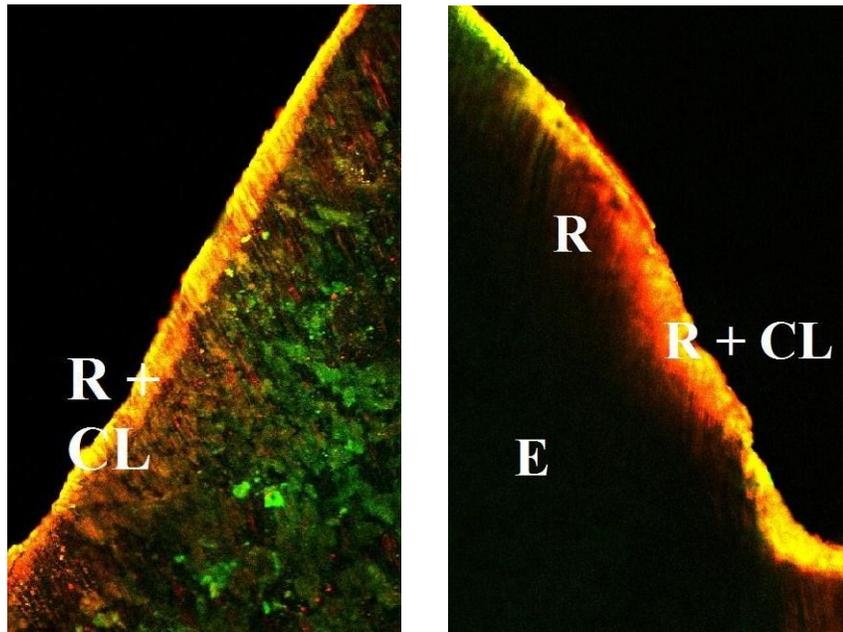


Figura 9. Imagens representativas (microscopia confocal de varredura a laser) de lesões infiltradas com resina experimental (E, esmalte sadio; R, resina infiltrada; R+CL, resina infiltrada nos poros da lesão de cárie).

4.6 Análise estatística

4.6.1 Avaliação dos resultados da microscopia confocal de varredura a laser

A partir das medidas de intensidade de fluorescência verde (cárie) e amarela (sobreposição: vermelho (material infiltrado) + verde) obteve-se a proporção de penetração do material (PM) na lesão de cárie, utilizando-se a seguinte equação:

$$PM = \frac{\text{verde} - \text{amarelo}}{\text{verde}} \times 100$$

Os cálculos foram realizados utilizando-se a planilha do EXCEL (Microsoft Office Excel 2007). Os valores de PM foram submetidos a análise de variância um fator e teste de Tukey, em nível de significância 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da intensidade de fluorescência através da Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Na Tabela 1 podem ser observadas as médias da intensidade de fluorescência dos materiais resinosos experimentais/esmalte cariado para os grupos estudados. Houve perda de um fragmento coronário no grupo 6 durante a confecção dos espécimes.

Tabela 1. Médias e Desvio Padrão (DP) dos valores da porcentagem de preenchimento dos materiais resinosos experimentais nas lesões de cárie em esmalte cariado através da análise em Microscopia Confocal de Varredura a Laser.

Grupo	Nº de dentes	Média (%) e Desvio Padrão
G1-100% TEGDMA	5	97,3 (8,48) BC
G2-80% TEGDMA + 20% etanol	5	104,3 (12,38) AB
G3-80% TEGDMA + 20% HEMA	5	104 (8,78) AB
G4-75% TEGDMA + 25% UDMA	5	92,8 (3,78) BC
G5-60% TEGDMA + 20% UDMA + 20% etanol	5	82,2 (6,28) C
G6-60% TEGDMA + 20% UDMA + 20% HEMA	4	103,4 (13,29) AB
G7-75% TEGDMA + 25% BisEMA	5	114 (12,41) A
G8-60% TEGDMA + 20% BisEMA + 20% etanol	5	107,5 (2,74) AB
G9-60% TEGDMA + 20% BisEMA + 20% HEMA	5	100,9 (5,86) AB

Letras maiúsculas iguais não diferem entre si na comparação entre o tipo de material resinoso experimental utilizado (p<0,05)

A maior média de percentual de preenchimento ocorrido na lesão de cárie ocorreu no G7 (75% TEGDMA + 25% BisEMA), enquanto que o menor valor foi obtido pelo grupo G5 (60% TEGDMA + 20% UDMA + 20% etanol). Os grupos G1 (TEGDMA 100%); G2 (80% TEGDMA + 20% etanol); G3 (80% TEGDMA + 20% HEMA); G4 (75% TEGDMA + 25% UDMA); G6 (60% TEGDMA + 20% UDMA

+ 20% HEMA); G8 (60% TEGDMA + 20% BISEMA + 20% etanol); G9 (60% TEGDMA + 20% BisEMA + 20% HEMA) não mostraram diferença significativa entre eles e apresentaram valores intermediários de penetração do material resinoso experimental.

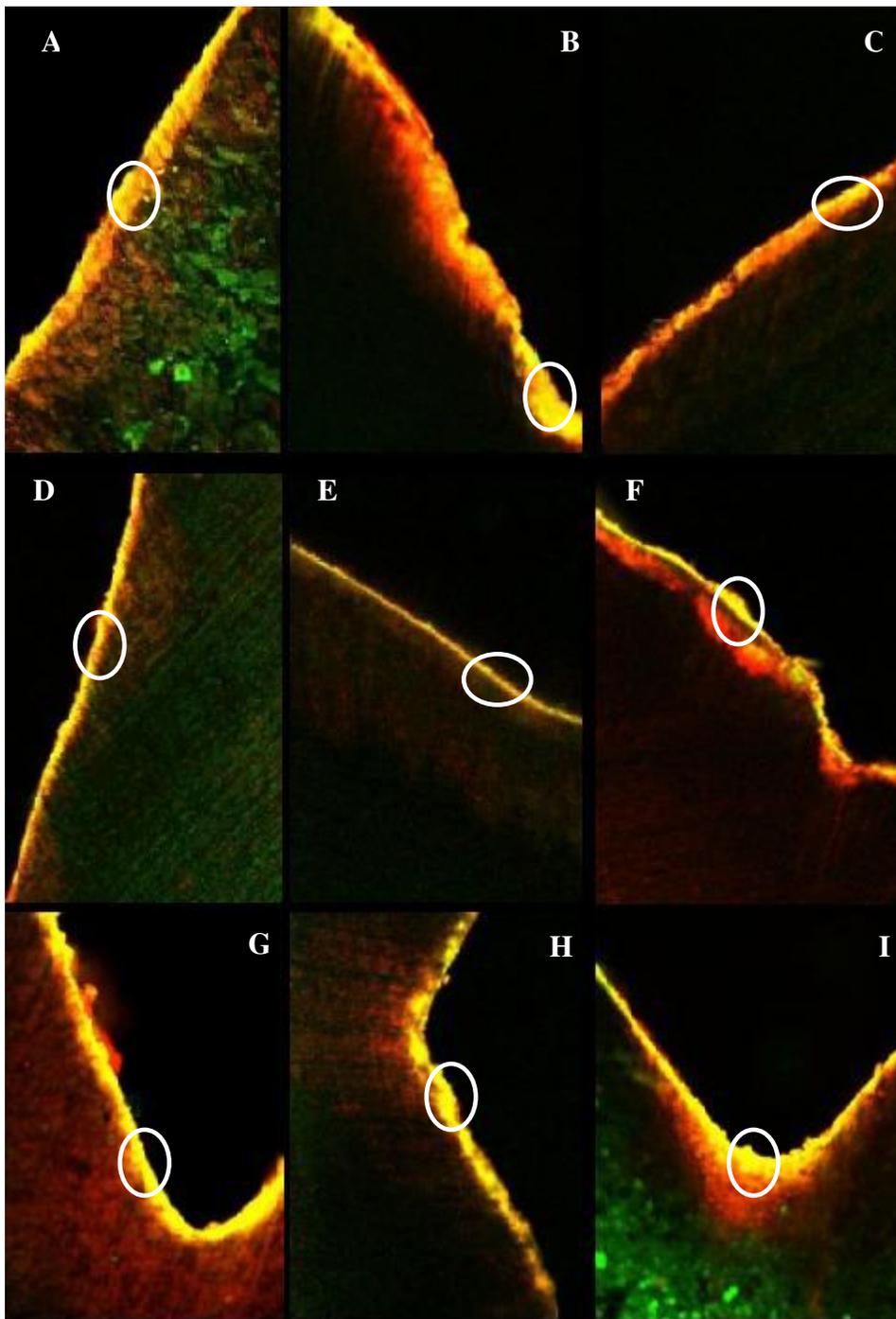


Figura 9. (A) G1: TEGDMA 100%; (B) G2: TEGDMA + etanol; (C) G3: TEGDMA + HEMA; (D) G4: TEGDMA + UDMA; (E) G5: TEGDMA + UDMA + etanol; (F) G6: TEGDMA + UDMA + HEMA; (G) G7: TEGDMA + BISEMA; (H) G8: TEGDMA + BisEMA + etanol; (I) G9: TEGDMA + BisEMA + HEMA

Círculo – ressaltando áreas de penetração do material resinoso de baixa viscosidade na LASCE. Toda área amarela nas imagens indica a penetração do material resinoso na LASCE oclusal.

Área vermelha: penetração do material impregnado com rodamina B a 0,1. Área verde: LASCE

6 DISCUSSÃO

Estudos tem sido realizados a fim de obter materiais resinosos de baixa viscosidade otimizados para a infiltração em lesões subsuperficiais de cárie em esmalte para que se consiga a penetração destes materiais no interior dos espaços intercrystalinos do esmalte desmineralizado. A quantidade de penetração é dependente das características superficiais do esmalte (energia de superfície e porosidades) e das características do líquido que deverá penetrá-lo (tensão superficial). Considerando que os poros da lesão de esmalte agem como caminhos de difusão para ácidos e minerais dissolvidos, através de forças capilares, a oclusão destes poros através da infiltração de resinas fotopolimerizáveis de baixa viscosidade poderia impedir ou diminuir a progressão da lesão e estabilizar mecanicamente a estrutura frágil da lesão (Davila *et al.*, 1975; Gray & Shellis, 2002).

Em relação aos materiais resinosos de baixa viscosidade, já foi mostrado em experimentos anteriores (Paris *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 1978) a existência de boa correlação entre o coeficiente de penetração e a profundidade de penetração dos monômeros em lesões cariosas de superfície lisa, livre ou proximal.

Monômeros como o BisGMA são viscosos pela natureza intrínseca das cadeias intermediárias não apresentando características adequadas para a utilização em infiltrantes. O TEGDMA apresenta viscosidade adequada para essa função, entretanto, características como a alta contração de polimerização e alta sorção de água fazem com que haja a necessidade da adição de co-monômero como o BisEMA, monômero diluente como o HEMA e solventes orgânicos para potencializar a capacidade de penetração nas porosidades do esmalte e da dentina (Soderpolin, *et al.*, 1999). Entretanto, dependendo do tipo de monômero e solvente utilizado pode-se alterar as propriedades da mistura, produzindo menor penetração nos tecidos duros dentários.

A hipótese deste estudo foi aceita uma vez que diferentes composições monoméricas produziram diferentes percentuais de preenchimento das lesões cariosas. Neste estudo, os maiores percentuais de penetração e preenchimento das lesões de cárie ocorreram quando se utilizou o monômero base TEGDMA associado ao BisEMA. Os resultados do presente estudo corroboram aqueles encontrados por Gonçalves *et al.*, 2009, que embora não tenham estudado a penetração de misturas monoméricas em esmalte, mostraram que misturas contendo BisEMA apresentaram baixa viscosidade devido a maior flexibilidade apresentada pela ausência de hidroxilas na cadeia. Observa-se clara associação entre o coeficiente de penetração de um líquido e a viscosidade apresentada pelo mesmo. Quanto maior a viscosidade, menor a capacidade e maior o tempo para penetrar em uma superfície sólida

O TEGDMA (trietileno glicol dimetacrilato; PM: 286,2 g mol⁻¹) possui o menor tamanho de polímero e a maior concentração de ligações duplas quando comparado com o BisEMA e UDMA, além de apresentar cadeia estrutural flexível (Asmussen, 1998). Sendo assim, este monômero deve exibir a maior densidade de ligações cruzadas e deve ser capaz de formar redes mais rígidas (Barszczewska-Rybarek, 2009). O BisEMA é um monômero que possui estrutura similar a do BisGMA, exceto pela ausência dos grupos hidroxila, atribuindo-se a ele menores valores de viscosidade em relação ao BisGMA. Além disso, é um monômero que apresenta características hidrófobas, sendo menos susceptível a sorção de água, o que favorece sua utilização no ambiente oral (Gonçalves *et al.*, 2009; Gaurav Vasudeva, 2009). Portanto, sugere-se que neste estudo, este monômero diluente, juntamente com o BisEMA, foi capaz de apresentar melhor penetração nos poros do esmalte cariado comparado aos outros grupos, devido às características próprias da molécula já descritas apresentando um bom desempenho na infiltração do material, mostrando um melhor resultado. Além disso, o grupo BisEMA:TEGDMA é o que potencialmente forma o melhor polímero, que associado a boa penetração, pode favorecer a durabilidade deste material no ambiente bucal a longo prazo. Entretanto, as propriedades mecânicas de misturas

contendo o BisEMA não foram ainda bem elucidadas. Sabe-se que concentrações entre 50:50 ou 30:70% de BisEMA:TEGDMA mostraram redução de 25% no grau de conversão em comparação com misturas do tipo BisGMA:TEGDMA (Sideridou *et al.*, 2002, 2003). Porém, outro estudo demonstrou que a troca de BisGMA por BisEMA em misturas com TEGDMA produziu maior grau de conversão, mas não melhorou a resistência à flexão e tensão diametral (Stansbury, 1992). Assim, outros estudos devem ser realizados para verificar as propriedades mecânicas da mistura contendo TEGDMA e BisEMA.

A adição do solvente etanol e do monômero UDMA na composição das resinas experimentais produziu materiais com valores menores de penetração dentro do corpo da lesão (G5= 60% TEGDMA + 20% UDMA + 20% etanol). O excesso de solvente incorporado no monômero pode formar poros na estrutura do polímero e na interface material/substrato (Asmussen *et al.*, 1977), prejudicando a penetração do material no interior da lesão. Mesmo seguindo o protocolo de secagem após a aplicação dos materiais que continham solvente na sua composição, isto parece não ter sido suficiente para a evaporação do solvente, o que pode ter influenciado no grau de conversão, e conseqüentemente, prejudicado a completa polimerização do material até o fundo da lesão. Esses resultados corroboram os de Meyer-Lueckel & Paris, 2010, que demonstraram que a adição de etanol em um material resinoso de baixa viscosidade a base de TEGDMA, com um coeficiente de penetração relativamente alto, resultou em redução da profundidade de penetração na lesão, quando comparado a uma resina.

A molécula de UDMA (uretano dimetacrilato) possui um núcleo alifático flexível e duas ligações uretano em sua cadeia. É também capaz de formar pontes de hidrogênio, possui menor tamanho, quando comparada ao BisGMA e BisEMA e portanto, apresenta maior concentração de ligações duplas (Barszczewska-Rybarek, 2009).

Uma possível explicação para este baixo grau de penetração de materiais do G5 pode estar relacionado com a menor densidade de ligações cruzadas obtidas pela mistura de monômeros. As forças de atração entre as

cadeias poliméricas são menores que as forças de atração entre as moléculas do solvente e os componentes das cadeias (Schneider *et al.*, 2008). Sendo assim, sugere-se que esta mistura tenha apresentado polimerização inferior aos demais materiais estudados.

De acordo com o estudo realizado por Paris *et al.*, 2007, os maiores coeficientes de penetração encontrados para as resinas compostas experimentais testadas foram observados para as misturas contendo altas quantidades de HEMA, TEGDMA e etanol, o que não justificaria a maior profundidade de penetração, necessariamente, já que mesmo apresentando características como baixa viscosidade e ângulos de contato, altas porções de HEMA e etanol também resultam em uma polimerização imperfeita do material, portanto, demonstrando que a quantidade de HEMA em resinas de baixa viscosidade é potencialmente limitada. Isto poderia justificar os valores intermediários obtidos para os grupos G1= TEGDMA 100%; G2: 80% TEGDMA + 20% etanol; G3: 80% TEGDMA + 20% HEMA; G4: 75% TEGDMA + 25% UDMA; G6: 60% TEGDMA + 20% UDMA + 20% HEMA; G8: 60% TEGDMA + 20% BisEMA + 20% etanol; G9: 60% TEGDMA + 20% BisEMA + 20% HEMA, que apresentaram na sua composição pelo menos um dos componentes, HEMA ou etanol.

Menores valores observados no grau de penetração dos materiais do grupo 5 e grupos com valores intermediários também podem ter sido produzidos pelas limitações da “técnica de pigmentação direta”. Esta técnica, mesmo com a utilização de um programa padronizado para a análise das imagens, a fim de superar alguns problemas com a pigmentação, pode não ter sido tão efetiva (Meyer-Lueckel & Paris, 2008).

Algumas composições apresentaram valores superiores a 100% de penetração dentro do corpo da lesão (G2, G3, G6, G7, G8 e G9), o que se justifica pela penetração do material além do corpo da lesão de cárie.

Desta forma, de maneira geral, todas as composições dos materiais apresentaram uma boa capacidade de penetração do material, entretanto, estes

valores de penetração variaram, apresentando o menor valor o G5 (88,2%) e o maior valor o G7 (114%).

Apesar dos resultados promissores da utilização dos compostos resinosos de baixa viscosidade para infiltração de lesões de cárie em esmalte, outros estudos devem ser realizados para assegurar o uso da técnica, verificando-se o desempenho e a longevidade da união dos materiais a estrutura do esmalte enfraquecido.

7. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos neste estudo, e dentro das suas limitações, pode-se concluir que a composição dos materiais é um fator determinante na penetração dos infiltrantes na LASCE, sendo que o material resinoso experimental composto por 75% de TEGDMA e 25% de BISEMA obteve o maior valor de intensidade de fluorescência, indicando maior grau de penetração do material dentro do corpo da lesão em esmalte e o grupo que apresentou 60% de TEGDMA, 20% de UDMA e 20% de etanol apresentou o menor grau de penetração do material no corpo da lesão.

REFERÊNCIAS*

1. Ahovuo-Saloranta A, Hiiri A, Nordblad A, Worthington H, Makela M. Pit and fissure sealants for preventing dental decay in the permanent teeth of children and adolescents. *Cochrane Database Systematic Review* 2004; 5:93–4.
2. Aranda M, Garcia-Godoy F. Clinical evaluation of retention and wear of light-cured pit and fissure glass ionomer sealant. *J Clin Pediatr Dent*. 1995; 19: 273-7.
3. Asmussen E, Peutzfeldt A. Influence of UDMA, BisGMA and TEGDMA on selected mechanical properties of experimental resin composites. *Dent Mater*. 1998; 14(1):51-6.
4. Asmussen E. Penetration os restorative resin into acid etched enamel. II. Dissolution os entrapped air in restorative resin monomers. *Acta Odontol Scand*. 1977; 35:183-91.
5. Atai M, Watts DC. A new kinetic model for the photopolymerization shrinkage strain of dental composites and resin monomers. *Dent Mater*. 2006; 22:785-791
6. Audio-Gold JT. Clinical evaluation of medium-filled flowable restorative material as a pit and fissure sealant. *Operat Dent*. 2002; 27:325-9.
7. Barszczewska-Rybarek, IM. Structure–property relationships in dimethacrylate networks based on Bis-GMA, UDMA and TEGDMA. *Dental Materials* 2009; 25(9):1082-1089.
8. Bergman G, Lind PO. A quantitative microradiographic study of incipient enamel caries. *J Dent Res*. 1966; 45:1477-1484.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do Internacional Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

9. Borsatto MC, Corona SA, Alves AG, Chimello DT, Catirse AB, Palma-Dibb RG. Influence of salivary contamination on marginal microleakage of pit and fissure sealants. *American Journal of Dentistry* 2004; 17: 365–7.
10. Brauer, GM. Properties of sealants containing BisGMA and various diluents. *J Dent Res.* 1978; 57: 597.
11. Buckton G. Interfacial phenomena in drug delivery and targeting. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1995.
12. Burrow MF, Inokoshi S, Tagami J. Water sorption of several bonding resins. *Am J Dent* 1999; 12 (6):295-8.
13. Cameron, A, Widmer, R. *Manual de Odontopediatria*. São Paulo: Santos, 2001. 368p.
14. Carvalho JC, Ekstrand KR, Thylstrup A. Dental plaque and caries on occlusal surfaces of first permanent molars in relation to stage of eruption. *J Dent Res.* 1989; 68(5): 773-9.
15. Celiberti P, Lussi A. Penetration ability and microleakage of a fissure sealant applied on artificial and natural enamel fissure caries. *Journal of Dentistry* 2007; 35: 59–67.
16. Collares FM. Influencia da proporção do HEMA nas propriedades de uma resina adesiva experimental.[dissertação]. Porto Alegre: UFRS; 2007
17. Croll TP, Cavanaugh RR. Enamel color modification by controlled hydrochloric acid-pumice abrasion. I. Technique and examples. *Quintessence Int* 1986; 17: 81–87.

18. Cury JA. Uso do flúor. In: BARATIERI, L. N. et al. Dentística: procedimentos preventivos e restauradores. 1ª Ed. Rio de Janeiro : Quintessence Int 1989; p. 43-47.
19. Cury JA. Fluoretação da água: benefícios, riscos e sugestões. ROBRAC, 1992; 2 (5):332-333.
20. D'Alpino PHP, Pereira, JC, Svizero NR, Rueggeberg FA, Pashley DH. Factors affecting use of fluorescent agents in identification of resin based polymers. J Adhes Dent 2006; 8: 285-292
21. Davila JM, Buonocore MG, Greeley CB, Provenza DV. Adhesive penetration in human artificial and natural white spots. J Dent Res 1975; 54:999–1008.
22. Dickens S, Stansbury J, Choi K, Floyd C. Photopolymerization kinetics of methacrylate dental resins. Macromolecules 2003; 36: 6043-6053
23. Donly KJ, Ruiz M. In vitro demineralization inhibition of enamel caries utilizing an unfilled resin. Clin Prev Dent 1992; 14:22-24.
24. Dye BA, Tan S, Smith V, Lewis BG, Barker LK, Thornton-Evans G, *et al.* Trends in oral health status: United States, 1988-1994 and 1999-2004. National Center for Health Statistics. Vital Health Stat 2007; 11:1-92.
25. el –Kalla IH, Garcia-Godoy F. Bond strength and interfacial micromorphology of compomers in primary and permanent teeth. Int J Paediatr Dent. 1998; 8:103-14.
26. Fan PL, Seluk LW, O'Brien WJ. Penetrativity of sealants. J Dent Res 1975; 54: 262-264

27. Feigal RJ, Quelhas I. Clinical trial of a self-etching adhesive for sealant application: success at 24 months with prompt-L-Pop. *Am J Dent.* 2003; 16: 249-51.
28. Fejerskov O, Manji F. Risk assessment in dent caries. In: Bader JD, editor. *Risk Assessment in Dentistry.* Chaper Hill: University of North Carolina. Department of Dental Ecology .1990; p. 215-7.
29. Fejerskov O, Kidd EAM. Dental Caries: The disease and its clinical management. In: Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EAM. *Clinical and histological manifestation of dental caries.* Ed Blackwell Munkgaard Oxford UK. 2003; p.80-86.
30. Ferracane JL. New polymer resins for dental restoratives. *Oper Dent* 6:199-209, 2001
31. Floyd CJ, Dickens SH. Network structure of BisGMA and UDMA based resin systems. *Dent Mater* 2006; 22:1143-1149
32. Frank RM. The ultrastructure of the caries-resistant teeth. *Ciba Foundation,* 1965 p.169-191.
33. Futatsuki M, Nozawa M, Ogata T, Nakata M. Wear of resin-modified glass-ionomers: an in vitro study. *J Clin Pediatr Dent.* 2001; 25: 297-301.
34. Gaurav Vasudeva MDS. Monomer systems for dental composites and their future: a review. *Monomers* 389-398, 2009.
35. Gillet D, Nancy J, Dupuis V, Dorignac G. Microleakage and penetration depth of three types of materials for fissure sealant: self-etching primer vs etching: an in vitro study. *J Clin Pediatr Dent.* 2002; 26: 175-8.

36. Goepferd SJ, Olberding P. The effect of sealing white spot lesions on lesion progression in vitro. *Pediatr Dent* 1989; 11: 14-16.
37. Gonçalves F *et al.*; Influence of matrix composition on polymerization stress development of experimental composites. *Dent Mater* 26 (2010) 697-703
38. Gonçalves F, Kawano Y, Pfeifer C, Stansbury JW, Braga RR. Influence of BisGMA, TEGDMA and BisEMA contents on viscosity, conversion, and flexural strength of experimental resins and composites. *Eur J Oral Sci* 2009; 117: 442-446.
39. Gray GB, Shellis P. Infiltration of resin into white spot caries-like lesions of enamel: an in vitro study. *Eur J Prosthodont Restor Dent*.2002,10:27–32.
40. Gushi LL *et al.* Cárie Dentária em Adolescentes de 15 a 19 Anos de Idade no Estado de São Paulo, 2002. *Cad. de Saúde Pública*, 2005, 21 (5): 1383-1391.
41. Hanning M, Grafe A, Microleakage EM. Evaluation of fissure sealants placed by use of self-etching priming agents. *J Dent*. 2004; 32:75-81
42. Hebling J, Feigal RJ. Use of one-bottle adhesive as an intermediate bonding layer to reduce sealant microleakage on saliva-contaminated enamel. *American Journal of Dentistry* 2000; 13: 187–91.
43. Hermsen RJ, Vrijhoef MM. Loss of enamel due to etching with phosphoric or maleic acid. *Dent Mater* 1993; 9: 332–336.
44. Hevinga MA, Opdam NJM, Frencken JE, Bronkhorst EM, Truin GJ. Microleakage and sealant penetration in contaminated carious fissures. *Journal of dentistry* 2007; 35: 909–914

45. Hicks MJ, Flaitz CM, Garcia-Godoy F. Fluoride-releasing sealant and caries-like enamel lesion formation in vitro. *J Clin Pediatr Dent.* 2000; 24(3): 215-9.
46. Hicks MJ, Silverstone LM. Acid-etching of caries-like lesions of enamel. A scanning electron microscopic study. *Caries Res.* 1984; 18: 327-35.
47. Imazato S, Walls A WG, Kuramoto A, Ebisu S. Penetration of an antibacterial dentine-bonding system into demineralized human root dentine in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110:168-74.
48. Khatri CA, Stansbury JW *et al.* Synthesis, characterization and evaluation of urethane derivatives of BisGMA. *Dent Mater* 19(7): 584-8, 2003.
49. Kidd EAM, van Amerongen JP. The role of operative treatment. In: *Dental caries: the disease and its clinical management.* Kidd E, Fejerskov O, editors. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2003 pp. 245-250.
50. Kielbassa AM, Gillman L, Zantner C, Meyer-Lueckel H, Helling E, Schulte-Monting J. Profilometric and microradiographic studies on the effects of toothpaste and acidic gel abrasivity on sound and demineralized bovine dental enamel. *Caries Research* 2005; 39: 380-386
51. Labella R, Davy KW. Monomethacrylate co-monomers for dental resins. *Eur J Oral Sci* 1998; 106 (3):816-24.
52. Larsen MJ, Brunn C. A química da cárie dentária e o flúor: Mecanismo de ação. In: Thylstrup A, Fejerkov O. *Cariologia clínica.* 2ª Ed. São Paulo: Ed. Santos. 2001; p. 231-58.

53. Lemon MT, Jones MS, Stansbury JW. Hydrogen bonding interactions in methacrylate monomers and polymers. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83: 734-46
54. Maltz M. Cárie dental: fatores relacionados. In: Pinto, V. G. *Saúde Bucal Coletiva*. São Paulo: Ed. Santos, 2000. cap. 11
55. Martignon S, Ekstrand KR, Ellwood R. Efficacy of sealing proximal early active lesions: an 18-month clinical study evaluated by conventional and subtraction radiography. *Caries Res* 2006; 40: 382–388.
56. Mathewson RJ, Morrison JT, Carpenter R. Modification of stained enamel surfaces: use of hydrochloric acid and pumice mixture. *J Okla Dent Assoc* 198; 77: 22–25.
57. McCloskey RJ. A technique for removal of fluorosis stains. *J Am Dent Assoc* 1984; 109: 63–64.
58. Meyer-Lueckel H., Paris S. Improved Resin Infiltration of Natural Caries Lesions. *J Dent Res* 2008a, 87(12):1112-1116.
59. Meyer-Lueckel H, Paris S. Progression of Artificial Enamel Caries Lesions after Infiltration with Experimental Light Curing Resins. *Caries Res* 2008b; 42: 117–124.
60. Meyer-Lueckel H, Paris S, Mueller J, Colfen H, Kielbassa AM. Influence of the application time on the penetration of different dental adhesives and a fissure sealant into artificial subsurface lesions in bovine enamel. *Dent Mater* 2006; 22: 22–28.

61. Muller J, Meyer-Lueckel H, Paris S, Kielbassa AM. Inhibition of lesion progression by penetration of resins in vitro: influence of the application procedure. *Oper Dent* 2006; 31: 338–45
62. Narvai, PC. Está ocorrendo um declínio de cárie no Brasil? *Jornal da ABOPREV*, 1996,1.
63. Narvai,PC. Castellanos RA, Frazao P. Dental caries prevalence in permanent teeth of schoolchildren in the Municipality of Sao Paulo, Brazil, 1970-1996. *Rev Saude Publica*. Apr/2000; 34(2): 196-200.
64. Newbrum, E; *Cariologia*. 2ed. São Paulo,Santos, 1988.
65. O'Brien WJ, Fan PL, Apostolides A. Penetrativity of sealants and glazes. The effectiveness of a sealant depends on its ability to penetrate into fissures. *Oper Dent* 1978; 3: 51-6
66. Oliveira TO, Arrais CAG, Aranha AC, Eduardo CP, Myake K, Rueggeberg FA, Giannini M. Micromorphology of resin dentin interfaces using one bottle etch&rinse and self-etching adhesive systems on laser treated dentin surfaces: a Confocal Laser Scanning Microscopy analysis. *Lasers in Surgery and Med* 42: 662-670 (2010)
67. Paes Leme AF, Tabchoury CPM, Zero DT, Cury JA. Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. *Am J Dent*. 2003; 16(2): 91-5.
68. Paris S, Meyer-Lueckel H, Mueller J, Hummel M, Kielbassa AM. Progression of sealed initial bovine enamel lesions under demineralizing conditions in vitro. *Caries Res*, 2006; 40: 124–129

69. Paris S, Meyer-Lueckel H, Cölfen H, Kielbassa AM. Penetration coefficients of commercially available and experimental composites intended to infiltrate enamel carious lesions. *Dent Mater* 2007; 23:742-748.
70. Paris S, Meyer-Lueckel H, Colfen H, Kielbassa AM. Resin infiltration of artificial enamel caries lesions with experimental light curing resins. *Dent Mater J.* 2007 26:582-588.
71. Paris S, Meyer-Lueckel H, Kielbassa AM. Resin infiltration of natural caries lesions. *J Dent Res.* 2007 86:662-666.
72. Paris S, Christof E. Dörfer, Hendrik Meyer-Lueckel Surface conditioning of natural enamel caries lesions in deciduous teeth in preparation for resin infiltration. *Journal of Dentistry* 38 (2010) 65 – 71.
73. Pashley EL, Zhang Y, Lockwood PE, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effects of HEMA on water evaporation from water–HEMA mixtures. *Dent Mater* 1998; 14 (1):6–10.
74. Pereira AC, Pardi V, Basting RT, Menighim MC, Pinelli C, Ambrosano GM, *et al.* Clinical evaluation of glass-ionomers used as fissure sealants: twenty-four-month results. *ASDC J Dent Child* 2001; 68:168-174
75. Pereira, AC *et al.* Condições bucais de escolares de 7 a 12 anos de idade, após 20 anos de fluoretação das águas de abastecimento público de Piracicaba. *Rev Paul Odontol*, 1995; 17 (3): 30-36
76. Perez-Lajarin L, Cortes-lillo O Garcia-Ballesta C, Chiva-Garcia F. An evaluation of bond strength to enamel of two sealants. *ASDC J Dent Child.* 2000; 24: 287-90.

77. Perry AO, Rueggeberg FA. The effect of acid primer or conventional acid etching on microleakage in photoactivated sealant. *Pediatr Dent*. 2003; 25:127-131
78. Peutzfel A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci*, 1997; 105 (2): 97-116
79. Pioch T, Stotz S, Staehle HJ, Duschner H. Applications of confocal laser scanning microscopy to dental bonding. *Adv Dent Res* 1997; 11:453-461
80. Robinson C, Hallsworth AS, Weatherell JA, Kunzel W. Arrest and control of carious lesions: a study based on preliminary experiments with resorcinol-formaldehyde resin. *J Dent Res*, 1976; 55: 812-818.
81. Robinson C, Brookes SJ, Kirkham J, Wood SR, Shore RC. In vitro studies of the penetration of adhesive resins into artificial caries-like lesions. *Caries Res*, 2001; 35: 136–141
82. Rodda JC. Impregnation of caries-like lesions with dental resins. *NZ Dent J* 1983; 79: 114-117.
83. Rodrigues CRMD, Fernandes FRC, Guedes-Pinto, AC. Cárie Dentária. In: Guedes-Pinto, A. C. *Odontopediatria*. São Paulo: Ed. Santos, 2003. Cap.21.
84. Rueggeberg FA. From vulcanite to vinyl, a history of resins in restorative dentistry. *J Prosthet Dent* 2002; 87: 364-379
85. Schmidlin PR, Zehnder M, Pasqualetti T, Imfeld T, Besek MJ. Penetration of a bonding agent into de- and remineralized enamel in vitro. *J Adhes Dent* 2004; 6: 111-15.

86. Scheineder FJ, Cavalcante LM, Consani S, Ferracane JL. Effect of coinitiator ratio on the polymer properties of experimental resin composites formulated with canphoroquinone and phenyl propanedione. *Dent Mater* 2009; 25: 369-375
87. Sideridou I *et al.* Study of water sorption, solubility and modulus of elasticity of light – cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials* 2003, 24(4): 655-65
88. Sideridou I *et al.* Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials* 2002; 23 (8):1819-29.
89. Silverstone LM. Structure of carious enamel, including the early lesion. *Oral Sci Rev.* 1973, 3:100-160.
90. Soderpolin KJ, Mariotti A. BisGMA based resins in dentistry: are they safe? *J Am Dent Assoc* 130:201-8, 1999
91. Spurr AR. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 1969; 26: 31–43.
92. Stansbury J, Dickens S. Network formation and compositional drift during photo initiated copolymerization of dimethacrylate monomers. *Polymer* 2001; 42:6363-9
93. Tay FR, Frankenberger R, Carvalho RM, Pashley DH. Pit and fissure sealing. Bonding of bulk-cured, low-filled, light-curing resins to bacteria-contaminated uncut enamel in high c-factor cavities. *Am J Dent.* 2005 Feb; 18 (1):28-36
94. Torii Y, Ito K, Hikasa R, Iwata S, Nishitani Y. Enamel tensile bond strength and morphology of resin-enamel interface created by acid etching system with or without moisture and self-etching priming system. *J Oral Rehabil.* 2002; 29:528-33

95. Van Landuyt K, De Munck J, Snauwaert J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y *et al.* Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives. *J Dent Res* 2005; 84 (2): 183–8.
96. Villena RS, Cury JA. O Uso Racional do Flúor na Infância: Enfoque dos Riscos e Benefícios. In: Corrêa, M. S. N. P. *Odontopediatria na Primeira Infância*. 2 ed. São Paulo: Ed. Santos, 2005. Cap. 25
97. Watson TF. Applications of confocal scanning optical microscopy to dentistry. *Br Dent J* 1991; 171:287-291
98. Yamamoto K, Kojima H, Tsutsumi T, Orguchi H. Effects of tooth-conditioning agents on bond strength of resin-modified glass-ionomer sealant to enamel. *J Dent* 2003; 31:13-8.

ANEXO

Comitê de Ética em Pesquisa

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Desempenho do selamento de lesões de cárie artificial em esmalte frente ao desafio cariogênico - Estudos in vitro e in situ. análise mecânica, micro-morfológica e bioquímica", protocolo nº 046/2006, dos pesquisadores Kamila Rosamília Kantovitz, Andréa Melo Moutinho da Costa, Giovana Spagnolo Albamonte de Araujo, Ravana Angelini Sfalcin, Regina Maria Puppim Rontani, Reginaldo Bruno Gonçalves, Roberta Caroline Bruschi Alonso e Tatiany Gabrielle Freire Araujo, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 19/03/2010.</p>		
<p>The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Performance of sealant in the enamel white spot lesion under cariogenic challenge - studies in vitro and in situ. Mechanical, micro- morphological and biochemical analysis", register number 046/2006, of Kamila Rosamília Kantovitz, Andréa Melo Moutinho da Costa, Giovana Spagnolo Albamonte de Araujo, Ravana Angelini Sfalcin, Regina Maria Puppim Rontani, Reginaldo Bruno Gonçalves, Roberta Caroline Bruschi Alonso and Tatiany Gabrielle Freire Araujo, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 03/19/2010.</p>		
		
Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas Secretário CEP/FOP/UNICAMP		Prof. Dr. Jacks Jorge Junior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP
<small>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</small>		

